

JP 00/05901

PCT/JP00/05901

30.08.00

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 20 OCT 2000

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1999年 8月31日

出 願 番 号
Application Number:

平成11年特許願第246797号

出 願 人
Applicant(s):

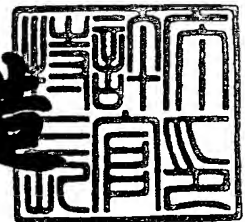
鐘淵化学工業株式会社

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年10月 6日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2000-3080808

【書類名】 特許願

【整理番号】 J199247416

【提出日】 平成11年 8月31日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C07K 1/00

C07K 14/195

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県神戸市西区伊川谷町潤和 1 2 1 0 番地の 4 2

【氏名】 中井 孝尚

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県姫路市船丘町 2 9 3 番地 ホワイトシャトー小林
2 - F 号

【氏名】 守川 壮一

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県明石市大蔵谷東山 4 7 8 番地の 6 3 0 2 号室

【氏名】 石井 清人

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県加古川市尾上町旭 3 - 4 1 グランドゥール尾上
4 0 9 号室

【氏名】 難波 弘憲

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県明石市小久保 1 2 0 番地の 5 5 A 8 0 4 号室

【氏名】 矢島 麗嘉

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県神戸市西区井吹台東町 5 丁目 2 1 番 3 号

【氏名】 池中 康裕

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県神戸市垂水区神和台 1 丁目 1 3 番 1 3 号

【氏名】 高橋 里美

明 細 書

デカルバミラーゼの立体構造およびその利用法

5 技術分野

本発明は、D-N-カルバモイル- α -アミノ酸を対応するD- α -アミノ酸に変換する酵素（以下、デカルバミラーゼという）の結晶に関する。また、本発明は、該結晶を用いたX線結晶構造解析により決定されたデカルバミラーゼの立体構造およびその利用、特に、該立体構造を利用したデカルバミラーゼの耐熱性、有機溶剤耐性、空気酸化に対する耐性等の安定性、酵素反応の至適pHの変更および比活性向上に関するアミノ酸の変異を設計する方法に関する。さらに、本発明は、上記立体構造を利用してデカルバミラーゼ変異体を製造する方法、得られたデカルバミラーゼ変異体、および、その利用に関する。

15 背景技術

光学活性なD- α -アミノ酸類は医薬中間体として重要な化合物であり、特に半合成ペニシリン類または半合成セファロスポリン類の製造中間体であるD-フェニルグリシン、D-パラヒドロキシフェニルグリシンなどが工業的に有用な化合物例として挙げられる。このようなD- α -アミノ酸類の製造法としては、対応するD-N-カルバモイル- α -アミノ酸類のカルバモイル基を除去してこれらを得る方法が公知であり、この際のカルバモイル基の除去は化学的方法または微生物の酵素反応を利用する方法によって行われる。

カルバモイル基の除去を行う酵素は、デカルバミラーゼと呼ばれる。この酵素は、D-N-カルバモイル- α -アミノ酸のD- α -アミノ酸類への変換を触媒する。この酵素は、シュードモナス属、アグロバクテリウム属、アエロバクター属、アエロモナス属、プレビバクテリウム属、バチルス属、フラボバクテリウ

ム属、セラチア属、ミクロコッカス属、アースロバクター属、アルカリゲネス属、
アクロモバクター属、モラキセラ属、パラコッカス属、プラストバクター属、お
よびコマモナス属から同定されている。デカルバミラーゼのアミノ酸配列および
／または核酸配列は、アグロバクテリウム属から決定されており、例えば、
5 *Agrobacterium radiobacter* NRRL B11291 お
よび *Agrobacterium* sp. KNK712 (カネカ菌) が挙げら
れる。

一般に、酵素は常温または高温でこれを反応に用いる工業利用の際の条件に耐
え得るほど十分な安定性を有していない場合が多く、その安定性が生産物のコス
10 トに影響する場合が多い。また、酵素反応を有利に進行させる手段として、固定
化酵素または固定化菌体等のいわゆる「バイオリアクター」として繰り返し反応
に用いることが行われているが、この際にも酵素の安定性によって使用回数が制
限され、生産物のコストに与える影響が大きい。

有用な反応を触媒する酵素を有効に工業利用するためには、安定性などの物性
15 または触媒能の高い優れた酵素を迅速かつ効率的に創製する手法が望まれる。物
性または機能を改良した酵素を取得する方法としては、酵素をコードする遺伝子
に化学処理または酵素処理などにより人為的な変異を加え、変異を含んだ組換え
体DNAを宿主細胞に導入して、目的の機能および／または物性を有する酵素を
スクリーニングするいわゆるランダムスクリーニング法がよく知られている。一
20 方、近年の構造生物学の進歩に伴い、酵素などの数多くのタンパク質の立体構造
がX線結晶解析またはNMR解析により明らかにされてきており、その立体構造
および分子設計手法を用いたタンパク質の物性または機能改変も盛んに行われる
ようになっている。

ここで、「タンパク質の立体構造」とは、あるアミノ酸配列を有するタンパク
25 質がある条件下で折り畳まれて形成される、ある条件およびそのアミノ酸配列に
よって規定されるタンパク質の三次元構造のことをいう。タンパク質の立体構造

は、例えば、X線結晶構造解析または核磁気共鳴によって決定され得る。

デカルバミラーゼの物性の改変については、ランダムスクリーニング法により耐熱性の向上した酵素生産株 (*E. coli* JM109) をスクリーニングすることに成功し、工業利用に有利なデカルバミラーゼ変異体が取得されている

5 (国際公開WO94/03613号パンフレット)。また、部位特異的変異誘発により、安定性の向上した変異体 (特開平9-173068号公報) が取得されている。しかし、これらの例は、アミノ酸の一次配列のみに基づいて変異体を作製したものであって、酵素の立体構造を利用した合理的な分子設計手法を活用したのではない。

10 これまでにデカルバミラーゼおよびその類縁酵素であって、その立体構造が明らかにされたものは知られていない。デカルバミラーゼは、アミノ酸配列が既に知られているタンパク質の配列データベース、PIR Release 57 (米国国立バイオテクノロジー情報センター、NCBI) に対する配列類似性解析からアミダーゼ、ニトリラーゼ等の加水分解酵素と25~30%程度の弱い配列類似性を有することが明らかになっている。しかしながら、弱い配列類似性を有す
15 るこれらの酵素の立体構造は、これまでいずれも明らかにされていない。そのため、分子設計手法でしばしば用いられる類似タンパク質の立体構造を用いたい
わゆるホモロジーモデリングの手法 (例えば、Swiss-Pdbviewer (モデリングプログラム) (Swiss Institute of Bioinformatics (SIB)、ExpASY Molecular Biology Server (<http://www.expasy.ch/> より
20 入手可能)) ; Guex, N. およびPeitsch, M. C. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling、Electrophoresis 18、2714-
25 2723) により、デカルバミラーゼの立体構造を推定することは事実上不可能

であった。また、仮に類縁酵素の立体構造が決定されたとしても、30%に満たない弱い配列類似性では、合理的な分子設計手法を適用するために十分な精度をもって立体構造モデルを得ることは難しい。酵素反応の至適pHの変更、比活性向上に関するアミノ酸変異等を精度良く予測し、それに基づき分子設計するためには、デカルバミラーゼの精密な原子座標データが必須である。デカルバミラーゼの立体構造を決定することができれば、精密な立体構造の解析、およびこれに基づく合理的な分子設計手法を適用することが可能となり、ひいては工業利用に有利な改変酵素を迅速かつ効率的に取得することも可能となる。

10 (発明が解決しようとする課題)

本発明は、このような課題を解決すべく、現在工業利用に供されているデカルバミラーゼの単結晶を取得し、X線結晶構造解析によりその立体構造を明らかにすることを目的とする。本発明はまた、デカルバミラーゼの立体構造を利用して、基質であるD-N-カルバモイル- α -アミノ酸類に対する反応性の向上、反応pHの最適化、熱および空気酸化に対する安定性向上等を目指した分子設計を行うことにより、工業利用により有利な優れたデカルバミラーゼ変異体を提供すること、および得られたデカルバミラーゼ変異体を利用したD- α -アミノ酸の製造方法を提供することを目的とする。

20 発明の開示

(課題を解決するための手段)

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、デカルバミラーゼの単結晶およびその重原子誘導体結晶を取得し、これら結晶の重原子同型置換法および多波長異常分散法を用いたX線結晶構造解析によりデカルバミラーゼの精密な立体構造を決定し、そしてこれらの立体構造を基に特性の改善された変異体を作製することにより、本発明を完成するに至った。

本発明は、直方晶系の空間群 $P 2_1 2_1 2$ および配列番号 1 に示されるアミノ酸配列、または直方晶系の空間群 $P 2_1 2_1 2_1$ および配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を有する、デカルバミラーゼ結晶に関する。結晶が直方晶系の空間群 $P 2_1 2_1 2$ および配列番号 1 に示されるアミノ酸配列、または空間群 $P 2_1 2_1 2_1$ および配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を有する、デカルバミラーゼ結晶に関する。一つの実施態様において、上記結晶は直方体形状の単位格子を有し、単位格子定数： $a = 66.5 \sim 68.5 \text{ \AA}$ 、 $b = 135.5 \sim 138.0 \text{ \AA}$ 、 $c = 66.5 \sim 68.5 \text{ \AA}$ を有し得る。また、上記アミノ酸配列が配列番号 1 であり得る。別の実施態様において、上記結晶は直方体形状の単位格子を有し得、そして単位格子定数： $a = 68.5 \sim 70.5 \text{ \AA}$ 、 $b = 138.0 \sim 140.5 \text{ \AA}$ 、 $c = 68.5 \sim 73.0 \text{ \AA}$ を有し得る。他の実施態様において、上記結晶は直方体形状の単位格子を有し得、そして、単位格子定数： $a = 81.5 \sim 82.5 \text{ \AA}$ 、 $b = 133.0 \sim 135.0 \text{ \AA}$ 、 $c = 119.5 \sim 121.5 \text{ \AA}$ を有し得る。また、上記アミノ酸配列は配列番号 2 であり得る。1つの局面において、本発明は結晶中のデカルバミラーゼ 1 分子当たり少なくとも 1 つ以上の重金属原子を含む結晶を提供し得る。一つの実施態様において、上記重金属原子は水銀、金、白金、鉛、イリジウム、オスミウムおよびウランのうちいずれかであり得る。他の実施態様において、本発明はデカルバミラーゼ結晶を液体窒素下で凍結させることにより調製される凍結結晶を提供し得る。

別の局面において、本発明は、デカルバミラーゼ結晶の製造方法であって、1 ～ 50 mg/ml の濃度でデカルバミラーゼの溶液を与える工程、5 ～ 30 重量%の濃度でポリエチレングリコール (PEG) あるいはメトキシポリエチレングリコール (PEGMME) を含有し、かつ 6.0 ～ 9.0 の pH を与える濃度の緩衝剤を含有する沈澱剤溶液を与える工程、該デカルバミラーゼ溶液を該沈澱剤溶液と混合する工程、および得られる混合溶液を、該溶液中のデカルバミラーゼ結晶が既定の大きさ以上に成長するまで既定の期間放置する工程を包含する、

方法を提供する。1つの実施態様において、本発明の方法はまた、混合する工程が、デカルバミラーゼ溶液の液滴を前記沈澱剤溶液の液滴と混合させることを包含し、そして放置する工程が、混合工程で得られる混合液滴を密閉容器中で沈澱剤溶液を保持する溶液溜め部上に懸垂させることを包含し、ここで、該溶液溜め部中の該沈澱剤溶液の蒸気圧は該混合液滴の蒸気圧より低い。本発明の方法はまた、混合する工程が、前記デカルバミラーゼ溶液の液滴を上記沈澱剤溶液の液滴と混合させることを包含し、そして上記放置する工程が、混合工程で得られる混合液滴を密閉容器中で沈澱剤溶液を保持する溶液溜め部の液滴台に静置させることを包含し、ここで、該溶液溜め部中の該沈澱剤溶液の蒸気圧は該混合液滴の蒸気圧より低い。別の実施態様において、本発明の方法における混合溶液を放置する期間は1日から3週間である。他の実施態様において、本発明の方法は、上記デカルバミラーゼの溶液を与える工程の後に、該デカルバミラーゼ溶液をサイズ排除半透膜内に配置させる工程をさらに包含し、そして前記混合する工程が、該半透膜を通して沈澱剤溶液を該デカルバミラーゼ溶液中に拡散させることをさらに包含する。他の実施態様において、本発明の方法における上記混合する工程が、上記沈澱剤溶液を前記デカルバミラーゼ溶液に徐々に添加することを包含し、そして上記放置する工程が、得られる混合溶液を密閉容器内で放置することを包含する。別の局面において、本発明は、図1に示すタンパク質立体構造トポロジーを有する立体構造により特徴付けられるデカルバミラーゼに関する。一つの実施態様において、本発明は、4本の α ヘリックスおよび12本の β ストランドの二次構造を含む4層サンドイッチ構造を有する、デカルバミラーゼに関する。本発明の好ましい実施態様において、酵素反応に関与するアミノ酸残基は、システイン1残基、グルタミン酸2残基、およびリジン1残基であり、酵素反応の基質がD-N-カルバモイル- α -アミノ酸であって、図3に示す基質結合様式を有する活性部位の立体構造により特徴付けられる。本発明の別の実施態様において、本発明は、デカルバミラーゼ活性を有する酵素分子であって、少なくとも、配列

番号1または2における以下のアミノ酸：46位のG l u、126位のL y s、
145位のG l u、および171位のC y sに対応するアミノ酸から形成される
活性部位腔を有する、酵素分子に関する。別の実施態様において、活性部位腔に
おいて、基質であるD-N-カルバモイル- α -アミノ酸は、反応時に前記配列
5 番号1または2の126位のL y s、143位のH i s、145位のG l u、1
74位のA r g、175位のA r g、および197位のT h rに対応するアミノ
酸と相互作用する。他の実施態様では、上記活性部位腔において、前記配列番号
1または2の46位のG l u、145位のG l uおよび171位のC y sに対応
するアミノ酸は水分子を介して水素結合している。なお別の実施態様において、
10 上記D-N-カルバモイル- α -アミノ酸は、D-N-カルバモイル-フェニル
グリシン、D-N-カルバモイル-パラヒドロキシフェニルグリシン、D-N-
カルバモイル-フェニルアラニン、D-N-カルバモイル-バリン、D-N-カ
ルバモイル-アラニン、D-N-カルバモイル-システイン、D-N-カルバモ
イル-アスパラギン酸、D-N-カルバモイル-グルタミン酸、D-N-カルバ
15 モイル-グリシン、D-N-カルバモイル-ヒスチジン、D-N-カルバモイル
-イソロイシン、D-N-カルバモイル-リジン、D-N-カルバモイル-ロイ
シン、D-N-カルバモイル-メチオニン、D-N-カルバモイル-アスパラギ
ン、D-N-カルバモイル-プロリン、D-N-カルバモイル-グルタミン、D
-N-カルバモイル-アルギニン、D-N-カルバモイル-セリン、D-N-カ
20 ルバモイル-スレオニン、D-N-カルバモイル-トリプトファン、D-N-カ
ルバモイル-チロシンからなる群から選択される。さらに別の実施態様において、
本発明は、本発明のデカルバミラーゼの立体構造から分子設計手法により構築さ
れた、デカルバミラーゼあるいはその変異体とD-N-カルバモイル- α -アミ
ノ酸あるいはD- α -アミノ酸との複合体立体構造により特徴付けられるデカル
25 バミラーゼ複合体に関する。

本発明の一つの局面において、本発明は、デカルバミラーゼ変異体を設計する

方法であって、デカルバミラーゼの請求項 14、16、または 21 のいずれか 1 項に記載の立体構造に基づいて物性および／または機能を改変したデカルバミラーゼ変異体を設計する工程、を包含する、方法に関する。別の局面において、本発明は、デカルバミラーゼ変異体を設計する方法であって、デカルバミラーゼ活性を有する酵素の結晶を生成する工程、該結晶の X 線結晶構造解析により立体構造を決定する工程、および決定した該結晶の立体構造に基づいて物性および／または機能の向上したデカルバミラーゼ変異体を設計する工程を包含する方法に関する。さらに別の局面において、本発明は、デカルバミラーゼ変異体を製造する方法であって、該方法が、デカルバミラーゼ活性を有する酵素の結晶を生成する工程、該結晶の X 線結晶構造解析により該結晶の立体構造を決定する工程、決定した該結晶の立体構造に基づいて物性および／または機能の向上したデカルバミラーゼ変異体を設計する工程、および該デカルバミラーゼ変異体を産生する工程を包含する、方法に関する。一つの実施態様において、本発明の方法で使用される上記立体構造は、本発明のデカルバミラーゼの立体構造である。別の実施態様において、上記デカルバミラーゼ変異体を設計する工程は、酵素の基質特異性の変更、酵素比活性の変更、酵素の安定性向上、至適 pH の最適化および酵素の水溶性の変更からなる群から選択される 1 以上の酵素特性の改変を目的とする。さらに別の実施態様において、上記デカルバミラーゼ変異体の製造方法は、酵素の安定性向上を目的とする。好ましくは、酵素の安定性向上に関する変異体の設計は空気酸化による活性低下を招くアミノ酸残基を置換する変異を含む。他の実施態様において、上記酵素特性の改変は、酵素比活性の変更および至適 pH の最適化を含む。

別の局面において、本発明は、本発明の方法によって得られたデカルバミラーゼ変異体に関する。本発明はまた、本発明の立体構造を利用してデカルバミラーゼのインヒビターをスクリーニングおよび／または設計する方法を提供する。さらに別の局面において、本発明は、デカルバミラーゼ結晶の立体構造またはデカ

ルバミラーゼの立体構造を利用して、アミノ酸一次配列がデカルバミラーゼと少なくとも30%の類似性を有する別のポリペプチド酵素またはタンパク質酵素を改変方法を提供する。

5 図面の簡単な説明

図1は、デカルバミラーゼのタンパク質立体構造トポロジー図である。 β ストランド構造を三角印で、 α ヘリックス構造を丸印で示した。「N-term」は網の末端を、「C-term」はカルボキシ末端をそれぞれ示す。

10 図2は、デカルバミラーゼのリボンストランド図である。 β ストランド構造を板状に、 α ヘリックス構造を螺旋で示した。触媒活性に関与するアミノ酸側鎖をボールスティック表記で示した。

図3は、デカルバミラーゼの活性部位における基質結合様式の模式図である。R-は、D- α -アミノ酸の側鎖である。残基番号および三文字表記によるアミノ酸名を示した。

15 図4は、デカルバミラーゼの触媒活性部位の立体構造である。 β ストランド構造を板状に、 α ヘリックス構造を螺旋で示し、触媒活性に関与するアミノ酸側鎖をボールスティック表記で表し、残基番号および三文字表記によるアミノ酸名を示した。

20 図5は、1.00 Åおよび0.98 Åの回折データから計算した差パターソン図のハーカー面である。

図6は、1.00 Åおよび1.27 Åの回折データから計算した差パターソン図のハーカー面である。

図7は、0.98 Åをアノマラス (anomalous) データとして計算したアノマラス差パターソン図のハーカー面である。

25 図8は、本発明の立体構造を示す、触媒活性部分の代表的な電子密度図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

本明細書において、「デカルバミラーゼ活性」とは、D-N-カルバモイル- α -アミノ酸を、そのアミノ酸を修飾しているカルバモイル基を除去してD- α -アミノ酸に変換する活性をいう。「デカルバミラーゼ」とは、デカルバミラーゼ活性を有する酵素をいう。デカルバミラーゼの例としては、配列番号1または配列番号2のアミノ酸配列を有する酵素が挙げられる。配列番号1のアミノ酸配列を有するデカルバミラーゼは、*Agrobacterium* sp. KKK712から単離され配列決定された。配列番号2のアミノ酸配列を有する酵素は、配列番号1からランダム変異によるスクリーニングにより、*E. coli* 変異株から得た酵素である。

本明細書において、デカルバミラーゼまたは他の酵素の変異体の「変異体」とは、もとの酵素のアミノ酸配列のアミノ酸が少なくとも1つ以上置換、付加、もしくは欠失、または修飾されたアミノ酸配列を有し、もとの酵素の活性の少なくとも一部を保持する改変された酵素をいう。「活性断片」とは、あるタンパク質酵素またはポリペプチド酵素のアミノ酸配列の一部を有する断片であって、もとの酵素の活性の少なくとも一部を保持する断片をいう。ここで、「活性の少なくとも一部」とは、代表的には、もとの酵素の少なくとも10%の比活性、好ましくは元の酵素の少なくとも50%の比活性をいうが、所望によって、10%未満の比活性をいう場合もある。

本明細書において、「ネイティブ結晶」とは、デカルバミラーゼを硫酸、ポリエチレングリコールなどの沈澱剤および添加塩類等を適切な組成で含有する緩衝液中で、単結晶にまで成長させたものであって、重金属原子を含有しない結晶をいう。

本明細書において、「重原子誘導体結晶」とは、以下のいずれかの結晶をいう：(i) 調製したネイティブ結晶を水銀、金、白金、鉛、イリジウム、オスミ

ウムおよびウランなどの重金属化合物を含んだ溶液に浸漬することで、結晶性を崩すことなく、結晶中のデカルバミラーゼに重金属原子を共有結合あるいは配位結合等により結合させた結晶、(i i) 硫酸、ポリエチレングリコールなどの沈澱剤および添加塩類等を適切な組成で含有する緩衝液であって、さらに適切な濃度で上記重金属化合物を含有する溶液中で、デカルバミラーゼを単結晶にまで成長させた結晶、および(i i i) デカルバミラーゼのメチオニンおよび/またはシステイン残基がセレノメチオニンおよび/またはセレノシステインに置換した変異体を用いて得られる結晶。

本発明の一つの実施態様において、配列番号1または2のアミノ酸配列を有するデカルバミラーゼの結晶は、用いる溶液の濃度およびpHを規定の範囲内（デカルバミラーゼの濃度については、1～50mg/ml、ポリエチレングリコールまたはメトキシポリエチレングリコールの濃度については5～30重量%、pHについては6.0～9.0）に細心に調節しながら、ポリエチレングリコール（PEG）またはメトキシポリエチレングリコール（PEGMME）、緩衝剤および任意の添加塩類を含有する沈澱剤溶液から成長させ得る。タンパク質の結晶成長に一般的に用いられる三種類の基本技術のいずれか、すなわち蒸気拡散法、透析法およびバッチ法（Methods in Enzymology、第114巻、Diffraction Methods for Biological Macromolecules Part A または第276巻 Macromolecular Crystallography Part A）のいずれかを用い得るが、蒸気拡散法が好ましい。

蒸気拡散法は、沈澱剤を含むタンパク質溶液の液滴を、より高濃度の沈澱剤を含む緩衝液（外液）の入った容器中に置き、密封後静置しておく方法である。液滴の置き方によって、懸滴（hanging-drop）法およびシッティングドロップ（sitting drop）法がある。懸滴（ハンギングドロップ）法は、タンパク質溶液の小さな液滴をカバーガラス上に配置し、カバーガラスを

溶液溜め（リザーバー）上で反転させ、密封する。他方、シッティングドロップ法では、リザーバー内部に適切な液滴台を設置し、タンパク質溶液の小滴を液滴台上に配置し、カバーガラス等でリザーバーを密封する。リザーバー中の溶液は沈澱剤を含有し、沈澱剤はタンパク質小滴中にも少量存在する。蒸気拡散法で使用する沈澱剤溶液は、以下の成分を含有するように形成させる：（a）分子量4000～9000、好ましくは平均分子量7500と10～20重量%の濃度とを有するPEGまたはPEGMME、（b）添加塩として0.1～0.5Mの濃度を有する食塩、塩化リチウム、塩化マグネシウム（最良の結果は0.2M塩化リチウムによって得られる）、および（c）pH6.5～8.0、好ましくはpH7.5を与えるに十分な量の緩衝剤。0.05～0.1MのHEPES（Sigma, St Louis, MO, USA）がこの目的に使用できる。リン酸ナトリウム、リン酸カリウムおよびトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンマレート等の他の緩衝剤もまた用い得る。

「バッチ法」とは、タンパク質溶液に沈澱剤溶液を少しずつ加え、わずかに濁ったところ不溶物を遠心分離して除去後、上清を小さな試験管に入れて密封した後、静置しておく方法をいう。また、「透析法」とは、タンパク質溶液を沈澱剤の入った緩衝液（外液）に対して、半透膜を用いて透析する方法をいう（Methods in Enzymology、第114巻、Diffraction Methods for Biological Macromolecules Part A）。

本明細書において、「既定の大きさ」とは、X線結晶構造解析で測定可能な最低限の大きさをいい、本発明のデカルバミラーゼの場合、好ましくは $0.3 \times 0.3 \times 0.1$ mmであり得る。また、「既定の期間」とは、結晶の大きさが既定の大きさ以上に達するのに十分な期間をいい、本発明のデカルバミラーゼの場合、好ましくは1日～3週間であり得る。

上記のように調製したX線結晶構造解析に適した既定の大きさを有する配列番

号1のデカルバミラーゼのネイティブ結晶は、(1)菱形板状の外形を有し、そして(2)同一外形を有する結晶であっても、異なる単位格子定数を有し得る。また、X線結晶構造解析には適さないが、沈澱剤、緩衝液等の条件を適切に選択することによって、針状あるいは柱状の外形を有する小型あるいは微小結晶が得られる。このような結晶の用途に関して酵素の微小結晶をグルタルアルデヒド等のタンパク質架橋試薬によって架橋することによって、有機溶媒を含む状態においても酵素反応を長期間安定に行うことを可能とするCLEC (Cross-Linked Enzyme Crystal) と呼ばれる技術が報告されている (N. L. St. Clair & M. A. Navia, (1992) J. Am. Chem. Soc. 114, 7314-7316)。本発明によって得られるデカルバミラーゼの結晶は、CLEC技術の適用範囲を拡大するものである。

本発明の1つの実施態様において、X線結晶構造解析に有効な重原子誘導体結晶、すなわちネイティブ結晶の結晶性を保持しつつ、結晶中のタンパク質に重金属原子が結合した結晶が提供される。重原子誘導体結晶は、タンパク質のX線結晶構造解析の基本技術である重原子同型置換法および多波長異常分散法を適用する際に利用される。デカルバミラーゼの重原子誘導体結晶は、ネイティブ結晶が溶解、崩壊せず少なくとも数日以上安定に保存され得る、所要の濃度を与える重金属化合物を含有させた溶液に結晶を浸漬する浸漬法により調製し得る。浸漬法に使用される重金属化合物は、金、白金、イリジウム、オスミウム、水銀、鉛、ウラン、サマリウムなどを含む金属塩あるいは有機金属化合物である。重金属浸漬法では、0.1~100 mM濃度の重金属化合物、例えば水銀化合物であるEMTS (エチル水銀チオサリチル酸ナトリウム塩)、カリウムジシアノ金(I)などを含有し、所望のpHを与える適切な沈澱剤および添加塩組成を有する保存溶液が使用し得る。保存溶液の好ましい例は、20~30重量%ポリエチレングリコール6000および0.2 M塩化リチウムを含む0.01 M HEPES緩衝液 (pH 7.5) である。重金属原子が結晶中に導入、すなわち結晶中のタン

パク質に結合しているかどうかの判定は、浸漬法により調製した結晶のX線回折強度データを収集し、あらかじめ取得しているネイティブ結晶の回折強度データと比較することによって行い得る。

あるいは、デカルバミラーゼを生産する微生物（例えば、アグロバクテリウム属のDNAを有する組換えE. coliなど）を重金属原子であるセレンを含有したセレノメチオニンあるいはセレノシステインを含む培地で生育、培養することにより、デカルバミラーゼ中のメチオニンあるいはシステイン残基がセレノメチオニンあるいはセレノシステインに置換した変異体が取得され得る。このように浸漬法を用いることなく重金属原子をタンパク質中に導入したデカルバミラーゼが取得されれば、上記条件等を用いた結晶化により重原子誘導体結晶を調製し得る。

一般に、タンパク質の結晶は、X線によりかなり損傷を受けることが知られているので、X線結晶構造解析を成功させるためには、損傷を受け難い結晶を取得することが重要である。近年では、結晶を凍結させ、凍結状態のままで回折データを測定することで高品質、高分解能の回折データを取得する試みが行われている（Methods in ENZYMOLOGY 第276巻、Macromolecular Crystallography, Part A, C. W. Carter, Jr. およびR. M. Sweet編、[13] Practical Cryocrystallography (D. W. Rodgers)）。一般に、タンパク質結晶の凍結には、凍結による結晶の崩壊を防ぐ目的で、グリセロールなどの凍結安定化剤を含む溶液で処理するなどの工夫がなされる。本発明においては、デカルバミラーゼのネイティブ結晶および重原子誘導体の凍結結晶は、凍結安定化剤を添加することなく、結晶化小滴あるいは浸漬溶液中の結晶を取り出し、液体窒素に直接浸漬して瞬時に凍結させることで調製し得る。凍結結晶はまた、凍結安定化剤を添加した保存液に浸漬した結晶に対して上記瞬時に凍結させる操作を行うことによっても調製し得る。

類縁タンパク質の立体構造が未知であり、その立体構造を利用した分子置換法による構造解析が不可能なデカルバミラーゼなどの新規タンパク質の立体構造決定においては、重原子同型置換法 (Methods in ENZYMOLOGY 第115巻、Diffraction Methods for Biological Macromolecules, Part B, H. W. Wyckoff, C. H. W. Hirs, およびS. N. Timasheff編、ならびにMethods in ENZYMOLOGY 第276巻、Macromolecular Crystallography, Part A, C. W. Carter, Jr. およびR. M. Sweet編) または多波長異常分散法 (S. N. Timasheff編、ならびにMethods in ENZYMOLOGY 第276巻、Macromolecular Crystallography, Part A, C. W. Carter, Jr. およびR. M. Sweet編) が適用され得る。すなわち、ネイティブ結晶および重原子誘導体結晶の回折データ間の回折強度差、あるいは異なる波長で測定した回折データ間の回折強度差から、電子密度を計算するための初期位相を求めることにより立体構造を決定し得る。重原子同型置換法または多波長異常分散法を適用するデカルバミラーゼの立体構造決定においては、重金属原子として例えば水銀、金、白金、ウラン、セレン原子などを含有した重原子誘導体結晶を用い得る。好ましくは、水銀化合物EMTSまたはカリウムジシアノ金 (I) を利用した浸漬法により得られる重原子誘導体結晶が用いられる。

ネイティブ結晶および重原子誘導体結晶の回折データは、R-Axis IIC (理学電機) あるいはSpring-8 (西播磨大型放射光施設) のタンパク質結晶構造解析用ビームラインを用いて測定し得る。多波長異常分散法を適用するための複数波長での回折データ測定は、Spring-8のタンパク質結晶構造解析用ビームラインを用いて実施し得る。測定した回折画像データは、R-Axis IIC付属のデータ処理プログラムまたはプログラムDENZO (マッ

クサイエンス) または同様な画像処理プログラム (または単結晶解析用ソフトウェア) を用いて、反射強度データに処理される。ネイティブ結晶の反射強度データ、複数波長での重原子誘導体結晶の反射強度データ波長の測定により得られた反射強度データから、差パターン図を利用して結晶中のタンパク質に結合した

5 重金属原子の位置を求めた後、プログラム PHASES (W. Furey, University of Pennsylvania あるいは CCP4 (British Biotechnology & Biological Science Research Council, SERC) または同様の回折データ解析プログラムを用いて重原子位置パラメータを精密化することにより初期位相が決定される。決定された初期位相は、プログラム DM (CCP4 パッケージ) または同様な位相改良プログラム (電子密度改良プログラム) を用いた溶媒平滑化法およびヒストグラムマッチング法に従って、デカルバミラーゼ結晶中の溶媒領域を 30 ~ 50 %、好ましくは 35 % として、低分解能から高分解能まで徐々に位相拡張計算を行うことにより信頼性の高い位相へと改良される。タン

10 パク質の結晶は、その体積の 30 ~ 60 % がタンパク質以外の溶媒分子 (主として水分子) で占有されている。本明細書において、溶液中の溶媒分子の占める体積を「溶媒領域」とする。一般に、得られたタンパク質結晶が非結晶学的な対称を有する場合には、非結晶学的対称 (NCS) 平均化と呼ばれる電子密度の平均化を行うことにより、さらに位相の信頼性を高めることが可能である。デカルバミ

15 ラーゼの結晶は、結晶の密度測定の結果から非対称単位中に 2 分子が含まれることがわかっており、結晶中のデカルバミラーゼ分子は非結晶学的な 2 回軸を持つことが推定される。溶媒平滑化法を適用した後の位相を用いて計算した電子密度図および精密化した重原子座標から、並進および回転を含む非結晶学的対称マトリックスが算出される。同時に溶媒平滑化法で得られた電子密度図から、マスク

20 と呼ばれるタンパク質の分子が存在する領域を同定し得る。非結晶学的対称マトリックスおよびマスクを用いて、プログラム DM などにより NCS 平均化計算を

行うことにより、信頼性の高い位相に改良され、立体構造モデルの構築に用いる電子密度図が得られる。

デカルバミラーゼの立体構造モデルは、プログラムオー（プログラムO）（A. Jones, Uppsala Universitet, スウェーデン）により
5 3次元グラフィックス上に表示した電子密度図から、以下の手順で構築し得る。
まず、特徴的なアミノ酸配列を有する複数の領域（トリプトファン残基を含む部分配列など）を電子密度図上で探し出す。次に、見出した領域を起点にしてアミノ酸配列を参照しながら、電子密度に適合するアミノ酸残基の部分構造をプログラムOを用いて3次元グラフィックス上で構築する。、順次この作業を繰り返す
10 ことにより、デカルバミラーゼのすべてのアミノ酸残基を相当する電子密度に適合させ、分子全体の初期立体構造モデルを構築する。構築された立体構造モデルは、それを出発モデル構造として、構造精密化プログラムであるXPLO（A. T. Brunger, Yale University）の精密化プロトコルに従って、立体構造を記述する三次元座標が精密化される。また、デカルバミラーゼ（例えば、配列番号1に示されるデカルバミラーゼ）のネイティブ結晶の立体
15 構造およびデカルバミラーゼ変異体（例えば、配列番号2に示される配列を有するデカルバミラーゼ変異体）ネイティブ結晶の立体構造は、得られたEMTS誘導体結晶の立体構造を用いた分子置換法により初期位相を求め、前記の電子密度改良、モデル構築、構造精密化手順に従うことにより各々の立体構造を決定し得る。
20 このことにより、本発明のデカルバミラーゼの立体構造の決定が完成される。
決定したデカルバミラーゼの立体構造について、タンパク質立体構造の公的データバンクであるプロテインデータバンク（PDB）に登録されている種々のタンパク質（デカルバミラーゼと機能において類似する酵素を含む）の立体構造との比較を行い得る。デカルバミラーゼと同様の脱カルバミル化反応を触媒するN-
25 カルバミル-ザルコシン-アミドヒドラーゼの立体構造が知られているが（プロテインデータバンクID、1NBA）、デカルバミラーゼの立体構造は、この

酵素の立体構造との構造類似性は認められない。プロテインデータバンクに立体構造が登録されているタンパク質の中では、ペニシリンアシラーゼ（1PNK）、グルコサミン-6-ホスフェイト合成酵素（1GDO）、グルタミン ホスホオリボシルピロホスフェイト アミドトランスフェラーゼ（1ECF）、およびプロテオソーム（1PMA）などがその立体構造に含まれるドメインと呼ばれる部分構造において、2層に積層した β シートの両側に α ヘリックス構造が密着した4層サンドイッチと呼ばれる構造を有しており、デカルバミラーゼの立体構造との類似性が認められる。しかし、これらドメイン構造とデカルバミラーゼの立体構造とは、 α ヘリックスおよび β ストランドの幾何学的な並び、いわゆるタンパク質立体構造トポロジー（T. P. Floresら、（1994）、Prot. Eng. 7、31-37）が異なっている。すなわち、デカルバミラーゼの立体構造は、 β シート構造内において平行 β ストランドを有することを特徴とするものであり（図1）、4層サンドイッチ構造を有するタンパク質としても、デカルバミラーゼは新規の立体構造である。このように、「トポロジー」とは、本明細書中において、タンパク質の二次構造単位の並びまたは空間配置のことをいう。

本明細書において、「 α ヘリックス」とは、タンパク質またはポリペプチドの二次構造の一つであり、アミノ酸が3.6残基ごとに1回転したピッチが5.4Åの螺旋構造を有するエネルギー的に最も安定な構造の1つをいう。 α ヘリックスを形成しやすいアミノ酸としては、グルタミン酸、リジン、アラニン、およびロイシンなどが挙げられる。逆に、 α ヘリックスを形成しにくいアミノ酸としては、バリン、イソロイシン、プロリン、およびグリシンなどが挙げられる。また、本明細書において、「 β シート」とは、タンパク質またはポリペプチドの二次構造の一つであり、ジグザグに伸びたコンホメーションを有する二本以上のポリペプチド鎖が平行に並び、ペプチドのアミド基およびカルボニル基が、それぞれ隣接するペプチド鎖のカルボニル基およびアミド基との間に水素結合を形成することによりエネルギー的に安定なシート状により合わさった構造をいう。なお、

「平行 β シート」とは、 β シートのうち、隣接するポリペプチド鎖のアミノ酸配列の並び方が同じ方向のものをいい、「逆平行 β シート」とは、 β シートのうち、隣接するポリペプチド鎖のアミノ酸の並び方が逆方向のものをいう。さらに、本明細書において、「 β ストランド」とは、 β シートを形成するジグザグに伸びた

5 コンフォメーションを有する1本のペプチド鎖をいう。

デカルバミラーゼのカルボキシ末端約30残基の領域（配列番号1または2のアミノ酸280位付近～カルボキシ末端303位）は、分子間相互作用により二量体形成に関与していることが明らかとなった。また、本研究に供したデカルバミラーゼ結晶中では、二量体がさらに分子間相互作用により四量体を形成していることが明らかとなった。デカルバミラーゼの4層サンドイッチ構造は、4本の α ヘリックスおよび12本の β ストランドの2次構造単位よりなる。表1においては、すべての2次構造単位を示した。

10

【表1】

デカルバミラーゼの2次構造単位

α ヘリックス	β ストランド
Arg20 -Arg36	Gln3 -Gln10
Glu61 -Asp65	Phe41 -Val43
Arg78 -Leu87	Gly90 -Val199
Glu145-Tyr148	Arg106-Val114
Prol77-Leu185	Ile120-Arg125
Thr211-Asn226	Val158-Val161
Arg279-Arg282	Ala164-Met168
	Ile190-Tyr195
	Trp229-Gly234
	Gly237-Glu239
	Cys242-Leu244
	Cys249-Val251
	Ile257-Leu260
	Glu267-Asp274

以下、本発明のデカルバミラーゼの立体構造の特徴についてまとめた。

(1) 6本の β ストランドからなる β シートが2層に積層し、その両側に各2本の α ヘリックスが密着した4層サンドイッチと呼ばれる構造を有する（図1およ

25

び図2)。図1において、アミノ末端から数えて1、3、5、および6番目の α ヘリックス4本（それぞれ、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 5$ 、および $\alpha 6$ と称する）が密着している。

5 (2) β シートは、6本の平行 β ストランドから主として形成され、立体構造既知のタンパク質には見られない配向を有する（図1）。

(3) 酵素反応を触媒するアミノ酸残基としてシステイン1残基、グルタミン酸2残基、リジン1残基、ヒスチジン1残基およびアルギニン2残基を含む、立体構造既知の酵素にない基質結合様式を有する（図3）活性部位を形成している（図4）。

10 (4) カルボキシ末端約30残基の領域が、分子間相互作用により二量体構造を形成している。

なお、上記立体構造の具体的な座標データは、プロテインデータバンク（PDB、Protein Data Bank、The Research Collaboratory For Structural Bioinformatics（RCSB）が運営）にCompound：N-Carbamyl-D-
15 -Amino Acid Amidohydrolase、Exp. Method：X-ray Diffractionとして登録されており（登録番号：1ERZ）、本明細書中でこのデータを援用する。

本発明のデカルバミラーゼの立体構造決定が完成することによって、酵素の触媒活性に
20 関与する残基を推定し得、さらに酵素単独の立体構造だけでなく、酵素に基質（例えば、D-N-カルバモイル-ヒドロキシフェニルグリシン）を結合させた複合体の立体構造モデルを分子モデリングの手法（Swiss-PDBViewer（前出）、Autodock（Oxford Molecular）、Guex、N. およびPeitsch、M. C.（1997）SWISS-MODEL and the Swiss-PDBViewer：An environment for comparative protein m
25

odeling, Electrophoresis 18, 2714-2723; Morris, G. M. ら, J. Computational Chemistry, 19:1639-1662, 1998; Morris, G. M. ら, J. Computaer-Aided Molecular Design, 10, 294-304, 1996; Goodsell, D. S. ら, J. Mol. Recognition, 9:1-5, 1996) により容易に構築し得る。本立体構造および立体構造モデルから、活性部位に存在し、触媒反応群のアミノ酸残基に関する構造および活性部位における反応機構に関する知見を入手し得る。デカルバミラーゼの活性部位は、Glu46、Lys126、His143、Glu145、Cys171、Arg174およびArg175のアミノ酸残基を含む腔（窪み）から形成されている（図4）。アミダーゼ、ニトリラーゼなど、デカルバミラーゼと弱い配列類似性を有する酵素とのアミノ酸配列比較により見出される保存されたアミノ酸残基の解析から、Glu46、Lys126、Glu145、Cys171が触媒反応に強く関与していることが示唆される。特にCys171は、酵素反応の中間体であるアシル中間体を形成するのに必須な触媒残基と推定され（図3）、デカルバミラーゼがシステインヒドラーゼであることを示している。本知見は、Cys171のSer171への変異で触媒活性が失われる実験事実にも一致している（R. Grifantini ら、（1996）、J. Biol. Chem. 271, 9326-9331）。Arg174およびArg175の役割は、基質であるD-N- α -カルバミルアミノ酸のカルボキシル基を静電相互作用によって、安定化することに寄与していると考えられる。

これら立体構造より得られた知見に基づいて、デカルバミラーゼの安定性向上または酵素活性の向上を目的とした改変設計を行い得る。本明細書において、酵素の「安定性」とは、通常の生体環境よりも高い温度（例えば70℃）で酵素を変性させた後でも、酵素活性が熱変性前と比較して、少なくとも10%、好ましくは少なくとも25%、より好ましくは少なくとも50%、さらに好ましくは少

なくとも80%、最も好ましくは少なくとも90%残存していることをいう。安定性の向上は、例えば、 ΔT_m (変性温度の差分) で測定し得る。本明細書において「酵素活性」とは、デカルバミラーゼについて言及する場合、D-N-カルバモイル- α -アミノ酸を対応するD- α -アミノ酸に変換する活性をいう。

- 5 本明細書において、変異体分子の「設計方法」または「分子設計手法」とは、変異前のタンパク質またはポリペプチド分子 (例えば、天然型分子) のアミノ酸配列および立体構造を解析することによって、各アミノ酸がどのような特性 (例えば、触媒活性、他の分子との相互作用など) を担うかを予測し、所望の特性の改変 (例えば、触媒活性の向上、タンパク質の安定性の向上など) をもたらすために適切なアミノ酸変異を算出することをいう。この設計方法は、好ましくはコンピュータを用いて行われる。このような設計方法で用いられるコンピュータプログラムの例としては、本明細書において言及されるように、以下が挙げられる：構造を解析するプログラムとして、X線回折データの処理プログラムであるDENZO (マックサイエンス) ; 位相を決定するための処理プログラムとして、PHASES (Univ. of Pennsylvania, PA, USA) ; 初期位相の改良のためのプログラムとして、プログラムDM (CCP4パッケージ, SERC) ; 3次元グラフィックスを得るためのプログラムとしてプログラムO (Uppsala Universitet, Uppsala, スウェーデン) ; 立体構造精密化プログラムとして、XPLORE (Yale University, CT, USA) ; そして、変異導入モデリングのためのプログラムとして、Swiss-PDBViewer (前出)。
- 10
15
20

- 本明細書中において、変異体の設計に利用されるアミノ酸変異としては、アミノ酸の置換のほかに、アミノ酸の付加、欠失、または修飾もまた挙げられる。アミノ酸の置換とは、もとのペプチドを1つ以上、例えば、1~20個、好ましくは1~10個、より好ましくは1~5個のアミノ酸で置換することをいう。アミノ酸の付加とは、もとのペプチド鎖に1つ以上、例えば、1~20個、好ましく
- 25

は1～10個、より好ましくは1～5個のアミノ酸を付加することをいう。アミノ酸の欠失とは、もとのペプチドから1つ以上、例えば、1～20個、好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個のアミノ酸を欠失させることをいう。アミノ酸修飾は、アミド化、カルボキシル化、硫酸化、ハロゲン化、アルキル化、グリコシル化、リン酸化、水酸化、アシル化（例えば、アセチル化）などを含むが、これらに限定されない。置換、または付加されるアミノ酸は、天然のアミノ酸であってもよく、非天然のアミノ酸、またはアミノ酸アナログでもよい。天然のアミノ酸が好ましい。

用語「天然のアミノ酸」とは、天然のアミノ酸のL-異性体を意味する。天然のアミノ酸は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、メチオニン、トレオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、システイン、プロリン、ヒスチジン、アスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン酸、グルタミン、 γ -カルボキシグルタミン酸、アルギニン、オルニチン、およびリジンである。特に示されない限り、本明細書でいう全てのアミノ酸はL体である。

用語「非天然アミノ酸」とは、タンパク質中で通常は天然に見出されないアミノ酸を意味する。非天然アミノ酸の例として、ノルロイシン、パラ-ニトロフェニルアラニン、ホモフェニルアラニン、パラ-フルオロフェニルアラニン、3-アミノ-2-ベンジルプロピオン酸、ホモアルギニンのD体またはL体およびD-フェニルアラニンが挙げられる。

「アミノ酸アナログ」とは、アミノ酸ではないが、アミノ酸の物性および/または機能に類似する分子をいう。アミノ酸アナログとしては、例えば、エチオニン、カナバニン、2-メチルグルタミンなどが挙げられる。

本発明のさらなる実施態様において、デカルバミラーゼの変異体はまた、アンモニウム塩（アルキルまたはアリールアンモニウム塩を含む）、硫酸塩、硫酸水素塩、リン酸塩、リン酸水素塩、リン酸二水素塩、チオ硫酸塩、炭酸塩、重炭酸塩、安息香酸塩、スルホン酸塩、チオスルホン酸塩、メシレート（メチルスルホ

ン酸) 塩、エチルスルホン酸塩、およびベンゼンスルホン酸塩のようなペプチドの塩の形態を取り得る。

以下、変異体を生成するためのタンパク質のアミノ酸の変異について議論する。アミノ酸の置換などを実施する方法は、化学合成、または遺伝子工学を利用する技術においてアミノ酸をコードするDNA配列のコドンを変化させることを含むが、これらに限定されない。

あるアミノ酸は、相互作用結合能力の明らかな低下または消失なしに、例えば、カチオン性領域または基質分子の結合部位のようなタンパク質構造において他のアミノ酸に置換され得る。あるタンパク質の生物学的機能を規定するのは、タンパク質の相互作用能力および性質である。従って、特定のアミノ酸の置換がアミノ酸配列において、またはそのDNAコード配列のレベルにおいて行われ得、置換後もなお、もとの性質を維持するタンパク質が生じ得る。従って、生物学的有用性の明らかな損失なしに、種々の改変が、開示されたペプチドまたはこのペプチドをコードする対応するDNAにおいて行われ得る。

上記のような改変を設計する際に、アミノ酸の疎水性指数が考慮され得る。タンパク質における相互作用的な生物学的機能を与える際の疎水性アミノ酸指数の重要性は、一般に当該分野で認められている (K y t e. J および D o o l i t t l e, R. F. J. M o l. B i o l. 1 5 7 (1) : 1 0 5 - 1 3 2, 1 9 8 2)。アミノ酸の疎水的性質は、生成したタンパク質の二次構造に寄与し、次いでそのタンパク質と他の分子 (例えば、酵素、基質、レセプター、DNA、抗体、抗原など) との相互作用を規定する。各アミノ酸は、それらの疎水性および電荷の性質に基づく疎水性指数を割り当てられる。それらは: イソロイシン (+4.5); バリン (+4.2); ロイシン (+3.8); フェニルアラニン (+2.8); システイン/シスチン (+2.5); メチオニン (+1.9); アラニン (+1.8); グリシン (-0.4); スレオニン (-0.7); セリン (-0.8); トリプトファン (-0.9); チロシン (-1.3); プロリ

ン（－１．６）；ヒスチジン（－３．２）；グルタミン酸（－３．５）；グルタミン（－３．５）；アスパラギン酸（－３．５）；アスパラギン（－３．５）；リジン（－３．９）；およびアルギニン（－４．５））である。

あるアミノ酸を、同様の疎水性指数を有する他のアミノ酸により置換して、そして依然として同様の生物学的機能を有するタンパク質（例えば、酵素活性において等価なタンパク質）を生じさせ得ることが当該分野で周知である。このようなアミノ酸置換において、疎水性指数が±２以内であることが好ましく、±１以内であることがより好ましく、および±０．５以内であることがさらに好ましい。疎水性に基づくこのようなアミノ酸の置換は効率的であることが当該分野において理解される。米国特許第４、５５４、１０１号に記載されるように、以下の親水性指数がアミノ酸残基に割り当てられている：アルギニン（＋３．０）；リジン（＋３．０）；アスパラギン酸（＋３．０±１）；グルタミン酸（＋３．０±１）；セリン（＋０．３）；アスパラギン（＋０．２）；グルタミン（＋０．２）；グリシン（０）；スレオニン（－０．４）；プロリン（－０．５±１）；アラニン（－０．５）；ヒスチジン（－０．５）；システイン（－１．０）；メチオニン（－１．３）；バリン（－１．５）；ロイシン（－１．８）；イソロイシン（－１．８）；チロシン（－２．３）；フェニルアラニン（－２．５）；およびトリプトファン（－３．４）。アミノ酸が同様の親水性指数を有し、かつ依然として生物学的等価体を与え得る別のものに置換され得ることが理解される。このようなアミノ酸置換において、親水性指数が±２以内であることが好ましく、±１以内であることがより好ましく、および±０．５以内であることがさらに好ましい。

本発明において、「保存的置換」とは、アミノ酸置換において、元のアミノ酸と置換されるアミノ酸との親水性指数または／および疎水性指数が上記のように類似している置換をいう。保存的置換の例は、当業者に周知であり、例えば、次の各グループ内での置換：アルギニンおよびリジン；グルタミン酸およびアスパ

ラギン酸；セリンおよびスレオニン；グルタミンおよびアスパラギン；ならびに
バリン、ロイシン、およびイソロイシン、などが挙げられるがこれらに限定され
ない。

酵素の比活性向上および反応の至適pHの最適化を目指した分子設計において
5 は、立体構造から得られた触媒反応機構に関する情報は極めて有用である。本発
明においては、デカルバミラーゼのCys 171の側鎖スルフィド(SH)基の
pKaを変化させることによって、比活性および至適pHの変化を伴うアミノ酸
変異を設計し得る。具体的には、タンパク質の静電ポテンシャル計算(高橋ら、
(1992)、Biopolymers 32, 897-909)により、SH
10 基のpKaに対するアミノ酸変異の効果を見積もることができ、適切なアミノ酸
変異を設計し得る。例えば、Cys 171の硫黄原子近傍の静電場をより正の電
場にし、Cys 171のチオール基(SH)の解離を促進させ、かつGlu 46
および/またはGlu 145の側鎖カルボキシ基近傍の静電場にはあまり影響し
ない変異が望ましい。

15 本発明のデカルバミラーゼの立体構造から、デカルバミラーゼ中に存在する5
つのシステイン残基は、触媒活性および空気酸化に対する耐性等の機能、物性に
関与していることが推定される。デカルバミラーゼのシステイン残基の役割につ
いては、上記菌株(Agrobacterium sp. KNK712(カネ
力菌))由来のデカルバミラーゼと比較して、高い配列相同性を有する、異なる
20 菌株(Agrobacterium radiobacter NRRL B1
1291)由来のデカルバミラーゼについて、アミノ酸変異ならびに変性剤およ
びCys修飾試薬の組合せによる研究がなされている(R. Grifantini
ら、(1996)、J. Biol. Chem. 271, 9326-9331)。
この研究では、5残基のシステインはいずれもジスルフィド結合の形成には関与
25 しないこと、Cys 171に対応するA. radiobacter NRRL
B11291由来のデカルバミラーゼのCys 172のSerへの置換で触媒

活性が失われるが、それ以外のシステインの変異では触媒活性に影響がないことから、C y s 1 7 1 が触媒活性に必須であることが推定されている。これは、他の類縁酵素においても、対応するシステイン残基が保存されていることから強く示唆される。本明細書中において、「対応する」アミノ酸とは、あるタンパク質分子またはポリペプチド分子において、比較の基準となるタンパク質またはポリペプチドにおける所定のアミノ酸と同様の作用を有するか、または有することが予測されるアミノ酸をいい、特に酵素分子にあっては、活性部位中の同様の位置に存在し触媒活性に同様の寄与をするアミノ酸をいう。

配列番号 1 および 2 のアミノ酸配列を有するデカルバミラーゼでは、また、C y s 1 9 2 および C y s 2 4 9 は化学修飾を受け難く、分子内に埋もれていることが、そして C y s 2 4 2 および C y s 2 7 8 は容易に化学修飾を受け、分子表面のループ構造部分に位置していることが推定されている。配列番号 1 の C y s 2 4 2 および C y s 2 7 8 に対応する、A. radiobacter NRRL B 1 1 2 9 1 の 2 残基（それぞれ、C y s 2 4 3 および C y s 2 7 9）のシステインをアラニンに置換することで安定性を向上した変異体が取得されている（特開平 8 - 8 4 5 8 4 号公報）。上記のように、C y s 2 4 2 および C y s 2 7 8 については、立体構造から分子表面に存在することが確認され、これら C y s 残基がデカルバミラーゼの空気酸化に対する耐性に関与していることが示唆される。分子内に埋もれた C y s 1 9 2 および C y s 2 4 9 については、空気酸化に対する耐性向上への寄与は大きくないと推定されるが、側鎖体積あるいは分子内空孔を補完するように、より嵩高い疎水性アミノ酸残基に置換した変異体を作製することにより、熱または有機溶剤に対する安定性の向上したデカルバミラーゼが創製され得る。

デカルバミラーゼの空気酸化による酵素活性の低下および保存安定性には、システイン残基だけでなくメチオニン残基の関与も考えられ得る。本発明のデカルバミラーゼの立体構造から、デカルバミラーゼ中にある 9 つのメチオニン残基の

うち、完全に分子内部に埋もれたものが5残基存在する一方で、完全に分子外部に露出したものが2残基 (Me t 2 3 8およびMe t 2 4 3) ターン構造部分に存在し、この2残基はデカルバミラーゼの空気酸化に対する耐性に大きく関わっていることが推定される。本明細書において「ターン」構造または「 β ターン」構造とは、タンパク質の立体構造において、二次構造の間で、ペプチド主鎖の進み方向を大きく変化させる3つ以上のアミノ酸残基からなる局所構造をいう。また、Me t 4およびMe t 7 2は、分子表面近傍に存在し、ほとんど分子内部に埋もれているが溶媒分子等ものの容易に接触し得る部位にあるため、これらもデカルバミラーゼの空気酸化に対する耐性に関与している可能性がある。これら構造的知見から、デカルバミラーゼの空気酸化に対する耐性向上が期待される別のアミノ酸置換を設計し得る。すなわち、Me t 4およびMe t 7 2を、側鎖体積あるいは分子内空孔を補完し、かつ空気酸化を受けない疎水性アミノ酸残基に置換した変異体を作製することにより耐性向上を達成し得る。Me t 2 3 8およびMe t 2 4 3は、完全に分子外部に露出していることから、好ましくはこれら残基を空気酸化を受けない中性あるいは親水性アミノ酸に置換することにより耐性の向上を達成し得る。さらに、デカルバミラーゼのアミノ酸Me t 2 3 8からMe t 2 4 3までの領域により構成されるターン構造部分には、空気酸化に弱いC y s 2 4 2も含まれることから、これら3残基を適切なアミノ酸に置換した3重変異体を作製、あるいは3残基を含むターン構造を欠失した変異体を作製することによって、空気酸化に対する耐性を向上し得る。また、これら残基を含むターン構造の配列を他のタンパク質の β ターン構造と入れ替えることによっても、空気酸化に対する耐性を向上し得る。システインおよびメチオニンの変異体設計においては、これら残基を他のアミノ酸にコンピューター上で変異させ、変異体の安定性について構造エネルギーを解析することにより、最適なアミノ酸を選択し得る。

システイン残基およびメチオニン残基以外にも、タンパク質分子内の空孔 (例

例えば、デカルバミラーゼのアミノ酸A s n 9 2の近傍に形成される空孔)を補填するアミノ酸変異、エネルギー的に不利なコンフォメーションを有するアミノ酸(例えば、デカルバミラーゼのアミノ酸P r o 2 0 3およびV a l 2 3 6)の変異、および α ヘリックス構造の安定化など、一般的に知られているタンパク質の安定化要因に着目した設計も行い得る。

前記アミノ酸変異による改変設計と異なる設計戦略として、デカルバミラーゼの酵素活性に関与しないと推定される領域を欠失させ、デカルバミラーゼをより低分子量の酵素へと改変することにより安定性を向上させ得る。例えば、活性部位から離れた位置にあるループ状構造領域の一部または全部を欠失させることにより、より緻密なデカルバミラーゼへと改変し得る。また、デカルバミラーゼのカルボキシ末端から約30残基の領域は、二量体形成に関与していることが本発明者らにより推定された。デカルバミラーゼは、一般的な緩衝液中において触媒能を示す場合は、二量体あるいは四量体として存在すると推定される。他方、タンパク質の変性状態からの巻き戻り過程からは、単量体タンパク質の方が有利であると推定される。カルボキシ末端約30残基の領域の一部または全部を欠失することにより、二量体形成を阻害し、安定な単量体を調製し得る。工業的には、デカルバミラーゼは担体に固定化したいわゆる固定化酵素として利用されるが、この場合も単量体の方が、より効率的な固定化を達成し得る。

本発明におけるデカルバミラーゼ変異体は、上記の方法以外にも、多くの方法により設計または調製され得る。例えば、デカルバミラーゼ活性を有する酵素の配列は、本発明を用いて変異に望ましいと同定された部位において、オリゴヌクレオチド特異的変異誘発または他の従来技術(例えば、欠失)手段により変異され得る。あるいは、デカルバミラーゼの変異体は、特定のアミノ酸の、天然に存在しないアミノ酸での部位特異的置換により作製され得る。例えば、デカルバミラーゼ変異体は、特定のシステインまたはメチオニン残基の、セレノシステインまたはセレノメチオニンとの置換により作製され得る。これは、天然システイ

ンまたはメチオニンのいずれか（あるいは両方）を涸渇させ、かつセレノシステインまたはセレノメチオニン（あるいは両方）を富化した増殖培地上で、野生型ポリペプチドまたは変異体ポリペプチドのいずれかを発現し得る宿主生物を増殖させることにより達成され得る。相同組換え法を用いる場合、合成オリゴヌクレオチドを用いて、デカルバミラーゼをコードするDNA配列中に変異が導入され得る。これらのオリゴヌクレオチドは所望の変異部位に隣接するヌクレオチド配列を含む。変異は、デカルバミラーゼの完全長DNA配列、あるいはそのフラグメントポリペプチドをコードする任意の配列中に作製され得る。

本発明に従って、上記方法または当該分野で公知の代替方法により產生される変異デカルバミラーゼ DNA配列は、発現ベクターを用いて発現され得る。当該分野で周知であるように、発現ベクターは、典型的には宿主ゲノムから独立した宿主細胞中での自己複製を可能にするエレメント、および選択目的のための1つ以上の表現型マーカーを含む。所望のデカルバミラーゼ変異体コード配列を囲むDNA配列の挿入の前または後に、発現ベクターはまた、プロモーター、オペレーター、リボソーム結合部位、翻訳開始シグナル、および必要に応じてリプレッサー遺伝子または種々のアクチベーター遺伝子ならびに終止シグナルをコードする制御配列を含む。いくつかの実施態様において、產生された変異体の分泌が所望される場合、「シグナル配列」をコードするヌクレオチドがデカルバミラーゼ変異体コード配列の前に挿入され得る。制御配列の制御下での発現のためには、所望のDNA配列は、制御配列に作動可能に連結されなければならない。すなわち、制御配列の制御下にあるデカルバミラーゼ変異体をコードする配列は、この配列の発現産物の產生を可能にするために、適切なリーディングフレームを維持するように開始シグナル（すなわちATG）を有さなければならない。

広範な周知の利用可能な発現ベクターは、いずれも本発明の変異されたデカルバミラーゼコード配列を発現するのに有用である。これらは、公知の細菌プラスミド（例えば、pBR322）、より広い宿主域のプラスミド（例えば、RP

4、ファージDNA)、2 μ プラスミドまたはそれらの誘導体のような酵母プラスミドならびにプラスミドおよびファージDNAの組合わせから得られるベクターのような、染色体DNA配列、非染色体DNA配列および合成DNA配列のセグメントからなるベクターを包含する。

5 さらに、DNA配列に作動可能に連結した場合、その発現を制御する、任意の広範な発現制御配列が、本発明による変異されたDNA配列を発現するためにこれらのベクター中で使用される。このような有用な発現制御配列としては、例えば、ウイルスの遺伝子発現を制御することが公知である他の配列およびこれらの組み合わせが挙げられる。

10 広範な種の宿主がまた、本発明によるデカルバミラーゼ変異体の産生に有用である。これらの宿主として、例えば、E. coli、BacillusおよびStreptomycesのような細菌、酵母のような真菌、CHO細胞のような動物細胞、植物細胞およびトランスジェニック宿主細胞が挙げられる。

15 すべての発現ベクターおよび発現系が、本発明の変異DNA配列を発現し、そしてデカルバミラーゼ変異体を産生するのに、同じ様式で機能するとは限らないことが理解されるべきである。全ての宿主が同一の発現系を用いて等しく良好に機能するわけではない。しかし、当業者は、過度な実験を行うことなくそして本発明の範囲を逸脱することなく、適切なベクター、発現制御配列および宿主を選択し得る。

20 例えば、選択の際は、そのベクターの複製能力が考慮されねばならない。発現制御配列の選択の際、種々の要因がまた考慮されるべきである。これらは、例えば、系の相対的強度、その制御能力、本発明のデカルバミラーゼ変異体をコードするDNA配列との適合性、特に潜在的二次構造に関する適合性がまた考慮されるべきである。宿主は、選択されたベクターとの適合性、宿主に対するデカルバミラーゼ変異体の毒性、成熟産物を分泌する能力、タンパク質を適切に折り畳む能力および適切な高次構造を形成する能力、発酵要求性、宿主からのデカルバミ

25

ラーゼ変異体の精製の容易さおよび安全性の考察により選択されるべきである。これらのパラメーター内で、当業者は有用な量の変異デカルバミラーゼを産生し得る、種々のベクター／発現制御系／宿主の組合わせを選択し得る。

5 これらの系または他の系で産生されるデカルバミラーゼ変異体は、デカルバミラーゼ活性を有する天然の酵素を精製するために使用される工程を含む種々の従来の工程により、精製され得る。

一旦、デカルバミラーゼへの変異が所望の位置（例えば、活性部位、安定性に関する部位、または結合部位など）で作製されると、得られた変異体は、目的のいくつかの特性のいずれかについて試験され得る。

10 例えば、変異体は、生理学的 pH における荷電の変化についてスクリーニングされ得る。これは変異前のデカルバミラーゼの等電点 (pI) と比較したデカルバミラーゼ変異体の等電点を測定することにより決定される。等電点は、Weilner, D., Analyt. Chem., 43, 597 頁 (1971) の方法によるゲル電気泳動により測定される。表面荷電が変化した変異体は、
15 本発明の構造情報により提供されるように、酵素の表面に位置する置換アミノ酸によって変化した pI を有するデカルバミラーゼタンパク質である。

さらに、変異体は、変異前のデカルバミラーゼと比較して高い比活性についてスクリーニングされ得る。変異体の活性は、例えば、本明細書中に記載のアッセイ（下記の実施例 7 を参照のこと）を用いて、D-N-カルバモイル- α -アミノ酸の D- α -アミノ酸類への変換能力を測定することにより決定される。
20

本発明のデカルバミラーゼ変異体を利用して製造された D- α -アミノ酸類は、医薬中間体（例えば、D-フェニルグリシンおよび D-パラヒドロキシフェニルグリシン）として、医薬（例えば、合成ペニシリンおよび合成セファロスポリン）の製造に利用し得る。このように製造した医薬を含有する薬学的組成物もまた、本発明に従って提供され得る。薬学的組成物は、賦形剤、安定剤、キャリア
25 などを含む薬学的に受容可能な任意の補助成分を含有し得る。

本発明のデカルバミラーゼ変異体を利用して製造されたD- α -アミノ酸類を農薬中間体（例えば、D-バリン）として、農薬（例えば、フルバリネート）の製造に利用し得る。このように製造した農薬を含有する農薬組成物もまた本発明に従って提供され得る。本明細書中において、農学組成物は、賦形剤、安定剤、
5 キャリアなどの農学的に受容可能な任意の補助成分を含有し得る。

本発明のデカルバミラーゼ変異体を利用して製造されたD- α -アミノ酸類を食品添加物の中間体（例えば、D-アラニンおよびD-アスパラギン酸）として、食品添加物（例えば、アリテーム）の製造に利用し得る。

本発明のさらに他の実施態様において、デカルバミラーゼ変異体またはそれに
10 類似する酵素のインヒビターが設計され、そして製造され得る。インヒビターは、デカルバミラーゼの構造情報を利用して設計され得る。当業者は、例えば、Segel, I. H., Enzyme Kinetics, J. Wiley & Sons, (1975) による標準式を用いるコンピューター適合酵素反応速度論データにより、インヒビターが競合的、不競合的、または非競合的であることを
15 同定し得る。さらに、デカルバミラーゼまたはその類似酵素の反応中間体（例えば、基質または反応生成物との複合体の立体構造）の情報を用いて、インヒビターを設計することが可能である。このような情報は、公知のデカルバミラーゼまたはその類似酵素インヒビターとして公知の化合物の改良アナログの設計、および新規クラスのインヒビターの設計に有用である。

20 本発明のさらに別の実施態様において、本発明のデカルバミラーゼの立体構造を利用して、デカルバミラーゼのアミノ酸配列に類似するポリペプチド酵素またはタンパク質酵素（例えば、アミダーゼまたはニトリラーゼ）を改変し得る。改変は、上記の変異体の設計と同様の指針に従って行われ得る。ここで、「類似する」ポリペプチド酵素またはタンパク質酵素は、好ましくは、そのアミノ酸配列
25 が、配列番号1または2に示されるデカルバミラーゼのアミノ酸配列と、全長アミノ酸配列について、代表的には少なくとも30%、好ましくは、少なくとも5

0%、より好ましくは、少なくとも80%同一であり、特にデカルバミラーゼの活性部位を規定する領域（配列番号1または2のアミノ酸G l u 4 6、L y s 1 2 6、G l u 1 4 5、およびC y s 1 7 1を含む、アミノ酸番号38~49、1 0 8~1 2 7、1 4 3~1 4 8および1 6 4~1 7 7の範囲）内のアミノ酸について、代表的には、少なくとも60%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは90%、さらに好ましくは95%同一である。

ある酵素についての特性を、類似する酵素の立体構造を用いて変換した例には、エクspanダーゼ（E x p a n d a s e）と称する酵素の基質特異性変換に類似構造を有するイソペニシリン合成酵素の立体構造を利用した研究がある。国際公開WO 97/02005号パンフレットを参照のこと。この文献においては、立体構造がすでに決定されたイソペニシリン合成酵素（R o a c h（1995）、Nature、375、700~704頁）と一次構造（アミノ酸配列）に類似性があり、その立体構造が類似することが示唆されていたエクspanダーゼの基質認識に関与するアミノ酸残基を両方の酵素の配列比較によって同定し、それらのアミノ酸残基の変異によってエクspanダーゼの基質特異性を変換してペニシリンGに作用する変異酵素を作製することに成功している。

アミノ酸配列の同一性の比較は、例えば、以下の配列分析用ツールを用いて算出し得る：FASTA（W. R. PearsonおよびD. J. Lipman、PNAS 85、2444-2448（1988））；BLAST（S. F. Altschul、T. L. Madden、A. A. Schaffer、J. -H. Zhang、Z. Zhang、W. Miller、およびD. J. Lipman（1997）Nuc l. A c i d s. R e s. 25:3389-3402（1997））；UnixベースのGCG Wisconsin Package（Program Manual for the Wisconsin Package、Version 8、1994年9月、Genetics Computer Group、575 Science Drive Madison、Wiscons

in, USA 53711; Rice, P. (1996) Program Manual for EGCG Package, Peter Rice, The Sanger Centre, Hinxton Hall, Cambridge, CB10 1RQ, England) および the ExPASy World Wide Web 分子生物学用サーバー (Geneva University Hospital and University of Geneva, Geneva, Switzerland) および MacVector 6.0 (帝人システムテクノロジー)。

本発明に従って、上記方法を利用して得られた、デカルバミラーゼのアミノ酸配列に類似するポリペプチド酵素またはタンパク質酵素の変異体が提供され得る。これらの酵素の変異体は、その野生型酵素に代えて、例えばバイオリアクターなどで、使用され得る。

別の局面では、本発明は、コンピュータを用いてデカルバミラーゼ変異体を設計するシステムを提供する。このシステムは、デカルバミラーゼ活性を有する酵素の結晶の立体構造を、X線結晶構造解析により決定する手段、ならびに決定した立体構造に基づいて物性および／または機能の向上したデカルバミラーゼ変異体を設計する手段を包含する。本発明に従うコンピュータシステムは、当該分野で公知のコンピュータシステムを用いて構築し得、例えば、本明細書において記載したような当該分野で公知のシステムが挙げられる。

本発明に従って、デカルバミラーゼなどの上記分子の立体構造の3次元座標データおよび／または分子設計手法および／または改変方法のプログラムを記録したコンピュータ読み取り可能な記録媒体もまた提供され得る。コンピュータ読み取り可能な記録媒体としては、例えば、磁気テープ、磁気ディスク（例えば、フロッピーディスクなど）、光磁気ディスク（例えば、MOなど）、光ディスク媒体（例えば、CD-ROM、CD-R、CD-RW、DVD-ROMなど）などが挙げられる。1つの実施態様において、このようなコンピュータ読み取り可能

な記録媒体は、デカルバミラーゼ変異体の設計処理を実行させるためのプログラムを記録したコンピュータ読み取り可能な記録媒体であり得る。ここで、この設計処理は、デカルバミラーゼ活性を有する酵素の結晶のX線結晶構造解析により決定された該結晶のデータを入力する工程、ならびに決定した立体構造に基づいて物性および／または機能の向上したデカルバミラーゼ変異体を設計する工程を5 包含し得る。別の実施態様において、本発明は、デカルバミラーゼ変異体の立体構造を記述するデータを記録する記録媒体を提供する。ここで、この変異体の立体構造は、デカルバミラーゼ活性を有する酵素の結晶のX線結晶構造解析により決定された該結晶のデータを入力する工程、ならびに決定した立体構造に基づいて物性および／または機能の向上したデカルバミラーゼ変異体を設計する工程、10 を包含する処理によって入手され得る。

以下の実施例にて、本発明をさらに詳細に説明するが、これらは本発明の例示の目的で提供されるものであり、なんら本発明を限定するものではない。

15 実施例

以下の実施例で使用した試薬類は、言及した場合を除き、ナカライテスク、和光純薬、またはSIGMA (St Louis, MO, USA) から入手した。

(実施例1) デカルバミラーゼのネイティブ結晶の調製

公知の方法 (H. Nanbaら, Biosci. Biotechnol. Biochem. 62, 875-881 (1998) を参照のこと) により得られた20 デカルバミラーゼを10~20mg/mlの濃度に調製したデカルバミラーゼ溶液(0.001M HEPES緩衝液、pH7.5) 10 μ lおよび沈澱剤として15~20重量%ポリエチレングリコール6000 (ナカライテスク社製)、0.2M塩化リチウムを含む0.1M HEPES緩衝液、pH7.5 (シグマ社製) 10 μ lを液滴台上で混合し、前記沈澱剤組成をもつ溶液300 μ lをリ25 ザーバー溶液として密封した後、蒸気拡散法により20~25℃で結晶化を行っ

た。結晶化開始後、約2日から二週間程度で $0.3 \times 0.3 \times 0.1$ mm $\sim 0.6 \times 0.6 \times 0.3$ mmの寸法にまで結晶が成長した。

(実施例2) デカルバミラーゼの重原子誘導体結晶の調製

実施例1で得られたネイティブ結晶を顕微鏡下、液滴台上の小滴より取り出し、
5 水銀化合物の一つであるEMTS（エチル水銀チオサリチル酸ナトリウム塩）濃度を $0.5 \sim 1.0$ mMに調製した20重量%ポリエチレングリコール6000（ナカライテスク製）、 0.2 M塩化リチウムを含む 0.1 M HEPES緩衝液（pH 7.5）に終夜浸漬させることにより重原子誘導体を調製した。

(実施例3) デカルバミラーゼ結晶の凍結

10 実施例1および2で調製したデカルバミラーゼのネイティブ結晶および重原子誘導体結晶を、グリセロール等の凍結安定化剤を添加することなく、結晶化液滴から取り出し、直接液体窒素に浸漬して瞬間凍結した。

(実施例4) デカルバミラーゼ結晶のX線回折データの収集

多波長異常分散法による解析を行うため、放射光施設Spring-8で回折
15 データ測定を行った。測定には、液体窒素中で凍結したEMTS誘導体結晶を用いて行った。測定は、水銀の異常分散を考慮した3波長（ 0.98 、 1.00 、 1.27 Å）で行った。3波長の回折データはすべて1個の結晶から収集することできた。測定した53フレーム分の回折画像データをデータ処理プログラムDENZO（McScience）にて処理した結果を表2に示した。デカルバミ
20 ラーゼのネイティブ結晶については、 1.00 Å波長を用いて凍結状態で回折データ測定を行い、その処理結果を表3に示した。なお、独立反射数、単位格子定数または格子定数などの用語についてはX線解析入門（角戸正夫ら、東京化学同人）を参照のこと。

【表 2】

デカルバミラーゼのEMTS誘導体結晶の回折データの処理結果

波 (Å)	長 (Å)	分 解 能 (Å)	R-merge (%)	收 率 (%)	独立反射数	単位胞定数 (Å)
0.98	1.8	5.1	98.5	56679		a=66.92 b=135.50 c=67.30
1.00	1.8	4.7	98.5	57493		a=67.23 b=136.13 c=67.65
1.27	2.0	5.8	86.5	36870		a=67.13 b=136.00 c=67.54

R-mergeは、複数測定した各フレーム間の誤差を表している。
【表 3】

デカルバミラーゼのネイティブ結晶の回折データの処理結果

波長 (Å)	分 解 能 (Å)	R-merge (%)	収率 (%)	独立反射数	格子定数 (Å)
0.93	1.7	6.4	96.1	68596	a=67.84 b=137.83 c=68.39

R-mergeは、複数測定した各フレーム間の誤差を表している。

(実施例 5) 重原子座標の決定および位相改良

- EMTS誘導体結晶について測定した3波長の回折データのうち1.00Åのデータをネイティブ結晶のデータと仮定して0.98Åをアノマラス(anomalous)、1.27Åをアイソモルファス(isomorphous)データとして、差パターソン関数およびアノマラス差パターソン関数を計算し、そのハーカー面(差パターソン図と呼ばれる。図5～図7)を描き、ハーカー面上の強度の強いピーク位置とそのクロスベクトルに相当する顕著なピーク位置から重原子位置の同定を試みた。各のハーカー面で強度の強いパターソンピークを2つの差パターソン図(1.00-0.98Åのデータ間および1.00-1.27Åのデータ間)から選び出し、2つの水銀原子(水銀1および水銀2)を同定し、その座標を求めた。確認は、まず、水銀1のみの座標を用いて位相を計算し、その位相を使って差フーリエ計算から水銀2の座標を計算し、水銀2の自己ピークおよび水銀1-水銀2の交差ピークが差パターソン図に存在するかどうかで判定

することにより行った。これら以外に結合した水銀原子の位置を見いだすために、水銀 1 および 2 の座標を用いて重原子位置パラメータの精密化および位相計算を行い、差フーリエ計算によりその位置を求め、水銀 2 を同定した場合と同様に自己ピークおよび交差ピークの確認を行った。その結果、さらに 4 個の水銀原子に相当する自己ピークおよび交差ピークを確認することができ、水銀 3、水銀 4、水銀 5 および水銀 6 の座標を決定した。

波長 1.00 Å で測定した 1.8 Å 分解能の EMTS 誘導体結晶のデータを用いて、求めた 6 個の水銀原子座標（重原子パラメータ）をプログラム MLPHARE (CCP4 パッケージ) (SERC) を用いて精密化し、初期位相を決定した。精密化後のフィギュア・オブ・メリット (figure of merit) の平均値は 0.50 であった。その後、プログラム DM (CCP4 パッケージ、SERC) を用いた溶媒平滑化法およびヒストグラムマッチング法をデカルバミラーゼ結晶中の溶媒領域を 35% として低分解能から高分解能まで徐々に位相を拡張することで初期位相の改良を行った。また、デカルバミラーゼの結晶は、結晶の密度測定の結果から非対称単位中に 2 分子が含まれることがわかっており、非結晶学的な対称を利用して、NCS 平均化と呼ばれる電子密度の平均化を行うことにより位相改良を行った。まず、この方法を適用するために、デカルバミラーゼ結晶中の非結晶学的な 2 回軸の決定を行った。溶媒平滑化法を適用した後の位相を用いて電子密度図を計算し、3 次元グラフィックス上で重原子位置および電子密度図を表示し、水銀原子の座標間の midpoint を結んだ 2 本の線が Z 軸（結晶学的な 2 回軸の 1 つ）上で直行していることがわかった。したがってデカルバミラーゼ分子は、この 2 本の非結晶学的な 2 回軸および結晶学的な 2 回軸の計 3 本が (2 2 2) の対称を持っていると推定された。電子密度図の各セクションを詳細に観察し、それぞれ 2 分子の中心座標を決定し、並進および回転を含む非結晶学的対称マトリックスを算出した。同時に溶媒平滑化法で得られた電子密度図からマスクと呼ばれるタンパク質の分子が存在する領域を同定した。求めた非結

晶学的対称マトリックスおよびマスクを用いて、プログラムDMを用いてNCS平均化計算を行った。その結果、2分子間の相関係数は、0.92と高い相関を示し、自由R因子 (free R-factor) は24.5%であった。改良された電子密度図は極めて明瞭 (例えば、図8を参照のこと。図8において、ペ
5 プチド主鎖のつながりが連続した電子密度として観察され、図中央には46位のGlu、171位のCys、および145位のGluと同定されるアミノ酸側鎖に対応する電子密度が観察される。) で、 α ヘリックスまたは β シートなどの二次構造部分はアミノ酸の主鎖の流れを明確に追うことができ、また芳香族アミノ酸側鎖などの電子密度も明瞭であった。

10 (実施例6) デカルバミラーゼの立体構造モデルの構築および精密化

実施例5で得られた電子密度図からプログラムオー(O) (Uppsala University) を用いて、3次元グラフィックス上でデカルバミラーゼの立体構造モデルを組み立てた。電子密度をアミノ酸配列に対応させるため、まず、トリプトファン残基など特徴的な電子密度を有する部分アミノ酸配列に
15 相当する電子密度を電子密度図上で見出し、アミノ酸配列を参照しながら電子密度に適合するアミノ酸残基の部分構造をプログラムOを用いて構築し、順次この作業を繰り返すことにより、デカルバミラーゼのすべてのアミノ酸残基(303残基)を相当する電子密度に適合させ、分子全体の初期立体構造モデルを構築した。得られた立体構造モデルを出発モデル構造として、立体構造精密化プログラムであるXPLORの精密化プロトコル(XPLORマニュアル、Yale University) に従って立体構造の精密化を行った。精密化は、電子密度図からのずれの大きい局所構造の修正および水分子に相当する電子密度を同定し精密
20 化計算に水分子を含める操作を繰り返し、R値および自由R値 (free R-factor) を指標に精密化を進めた。水分子を加えたネイティブ結晶における最終モデル構造のR値は、500-1.7 Å分解能の反射データに対して、1
25 9.6%であった。

(実施例 7) デカルバミラーゼの安定化設計

デカルバミラーゼの安定化設計の一例として、エネルギー的に不利なアミノ酸残基を変異することにより安定性の向上が見られた例を示す。本発明の立体構造から計算した 203 位のプロリン、Pro 203 の主鎖二面角 ($\phi = -60^\circ$ 、 $\psi = -44^\circ$) は、 α ヘリックス構造に特徴的な二面角を有している。一般にプロリン残基は、ヘリックス構造を不安定化する、あるいは壊す残基として働くことが知られている。デカルバミラーゼの 203 位にプロリンが存在することで、主鎖構造に歪みを生じ、構造を不安定化すると推定される。この部位は、ヘリックス構造に特徴的な二面角を有することから、ヘリックス構造に適したアミノ酸残基に置換することにより、天然状態の構造エネルギーを安定化しうる。例えば、 α ヘリックス構造を取りやすいアミノ酸残基として、アラニン (Ala)、グルタミン酸 (Glu)、ロイシン (Leu)、セリン (Ser) などに置換しうる。203 位のアミノ酸を天然型 20 種類のアミノ酸に変異し、それぞれの構造については、AMBER のポテンシャルパラメーター (Weiner, P. A. ら、J. Comp. Chemistry 7 (2) : 230-252, 1986) により構造エネルギーを算出し、構造エネルギー値の低いアミノ酸変異がより望ましい変異であるとして、この部位での最適アミノ酸変異を求めた。その結果、アスパラギン酸>スレオニン>セリン>バリン>グルタミン酸>イソロイシン>アラニン>フェニルアラニン>チロシン>ロイシン>ヒスチジン>アスパラギン>グルタミン>システイン>プロリンとなった。実施例 1 で調製したアミノ酸変異体の変性温度を表 4 に示す (国際公開番号 WO 94/03613)。以下のいずれの変異においても、安定性の向上 ($\Delta T_m = 3.4 \sim 8.2^\circ\text{C}$) が認められる。これらは、プロリン以外のアミノ酸に変異したことで、主鎖構造の歪みを解消したと考えるのが妥当である。また、グルタミン酸 ($\Delta T_m = 8.2^\circ\text{C}$) に変異したものが最も高い安定性を示すが、これはグルタミン酸への変異により、グルタミン酸の側鎖カルボキシル基が近傍にある 139 位のアルギニン側鎖のグアニジ

ノ基とイオン結合あるいは水素結合を形成することができ、新たに加わった相互作用の寄与として他の変異体に比べ高い安定性を示すと考えられる。His変異体の安定性の増加が、 $\Delta T_m = 3.4^\circ\text{C}$ と他の変異体に比べて小さいのは、pH 7.0付近でヒスチジンが正電荷を持った場合、139位のアルギニンとの静電的な反発により、主鎖の歪みを解消することによる安定化の寄与分を減じたためと考えられる。

計算により求めた203位の最適アミノ酸変異の安定性の順位は、実験により求めた変性温度の向上の大きさと完全には一致しないが、いずれも天然型デカルバミラーゼのプロリン残基よりも構造エネルギーの低い（安定な）方から数えて上位に位置し、実験結果とよく一致した。

【表4】

203位のアミノ酸変異による熱安定性の変化

変異株	変異部位	アミノ酸変異	変性温度 ($^\circ\text{C}$)	ΔT_m
404	Pro203	Leu	68.0	6.2
406	Pro203	Ser	66.5	4.7
429	Pro203	Glu	70.0	8.2
445	Pro203	Thr	67.5	5.7
468	Pro203	Ala	67.7	5.9
469	Pro203	Ile	67.2	5.4
470	Pro203	His	65.2	3.4

変性温度は、上記のように調製した（粗）酵素液を各温度にて10分間の熱処理、熱変性による不溶物を除去した後の活性を測定し、残存比活性50%を示す温度と定義する。残存比活性の測定は以下のように行った。1.0重量%になるようにN-カルバモイル-D- α -パラヒドロキシフェニルグリシンを0.1Mリン酸緩衝液pH7.0に溶解した基質溶液1mlに、酵素溶液0.1mlを加え、40 $^\circ\text{C}$ 、20分間反応させ、20%トリクロロ酢酸0.25mlを添加して酵素反応を停止させた後、活性を変換されたD- α -パラヒドロキシフェニルグ

リシンを内部標準としてD-フェニルアラニンを用いて高速液体クロマトグラフィーにより定量することにより算出した。変異株は、スクリーニングで得られた変異株の識別番号を示す。 ΔT_m は、変異前のデカルバミラーゼの変性温度からの差異を示す。

5

産業上の利用可能性

本発明によれば、デカルバミラーゼおよびデカルバミラーゼ変異体の立体構造および変異体の立体構造モデルが提供される。本酵素の立体構造は、耐熱性、有機溶剤耐性、空気酸化に対する耐性等の安定性、酵素反応の至適pHの変更および比活性向上に関するアミノ酸変異の合理的な分子設計に有用である。このこと
10 によって、工業利用に有利な改変酵素を迅速かつ効率的に取得することが可能となる。さらには、本酵素の立体構造が類縁関係にあるアミダーゼまたはニトリラーゼなどの酵素群の中で唯一決定されたものであり、これら酵素群の工業利用分野で有意義に応用され得ることは明らかである。

請 求 の 範 囲

1. 直方晶系の空間群 $P 2_1 2_1 2$ および配列番号 1 に示されるアミノ酸配列、
または直方晶系の空間群 $P 2_1 2_1 2_1$ および配列番号 2 に示されるアミノ酸配列
5 を有する、デカルバミラーゼ結晶。
2. 前記結晶が直方体形状の単位格子を有し、単位格子定数： $a = 66.5 \sim 68.5 \text{ \AA}$ 、 $b = 135.5 \sim 138.0 \text{ \AA}$ 、 $c = 66.5 \sim 68.5 \text{ \AA}$ を有し、
そして前記アミノ酸配列が配列番号 1 である、請求項 1 に記載のデカルバミラー
10 ゼ結晶。
3. 前記結晶が直方体形状の単位格子を有し、単位格子定数： $a = 68.5 \sim 70.5 \text{ \AA}$ 、 $b = 138.0 \sim 140.5 \text{ \AA}$ 、 $c = 68.5 \sim 73.0 \text{ \AA}$ を有し、
そして前記アミノ酸配列が配列番号 1 である、請求項 1 に記載のデカルバミラー
15 ゼ結晶。
4. 前記結晶が直方体形状の単位格子を有し、単位格子定数： $a = 81.5 \sim 82.5 \text{ \AA}$ 、 $b = 133.0 \sim 135.0 \text{ \AA}$ 、 $c = 119.5 \sim 121.5 \text{ \AA}$ を
有し、そして前記アミノ酸配列が配列番号 2 である、請求項 1 に記載のデカルバ
20 ミラーゼ結晶。
5. 結晶中のデカルバミラーゼ 1 分子当たり少なくとも 1 つ以上の重金属原子
を含む請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の結晶。
- 25 6. 重金属原子が水銀、金、白金、鉛、イリジウム、オスミウムおよびウラン
のうちいずれかである請求項 5 に記載の結晶。

7. 請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載のデカルバミラーゼ結晶を液体窒素下で凍結させることにより調製される凍結結晶。

5 8. デカルバミラーゼ結晶の製造方法であって、1～50 mg/ml の濃度でデカルバミラーゼの溶液を与える工程、5～30 重量%の濃度でポリエチレングリコール (PEG) あるいはメトキシポリエチレングリコール (PEGMME) を含有し、かつ 6.0～9.0 の pH を与える濃度の緩衝剤を含有する沈澱剤溶液を与える工程、該デカルバミラーゼ溶液を該沈澱剤溶液と混合する工程、およ
10 び得られる混合溶液を、該溶液中のデカルバミラーゼ結晶が既定の大きさ以上に成長するまで既定の期間放置する工程を包含する、方法。

9. 前記混合する工程が、前記デカルバミラーゼ溶液の液滴を前記沈澱剤溶液の液滴と混合させることを包含し、そして前記放置する工程が、混合工程で得
15 られる混合液滴を密閉容器中で沈澱剤溶液を保持する溶液溜め部上に懸垂させることを包含し、ここで、該溶液溜め部中の該沈澱剤溶液の蒸気圧は該混合液滴の蒸気圧より低い、請求項 8 に記載の方法。

10. 前記混合する工程が、前記デカルバミラーゼ溶液の液滴を前記沈澱剤溶液の液滴と混合させることを包含し、そして前記放置する工程が、混合工程で得
20 られる混合液滴を密閉容器中で沈澱剤溶液を保持する溶液溜め部の液滴台に静置させることを包含し、ここで、該溶液溜め部中の該沈澱剤溶液の蒸気圧は該混合液滴の蒸気圧より低い、請求項 8 に記載の方法。

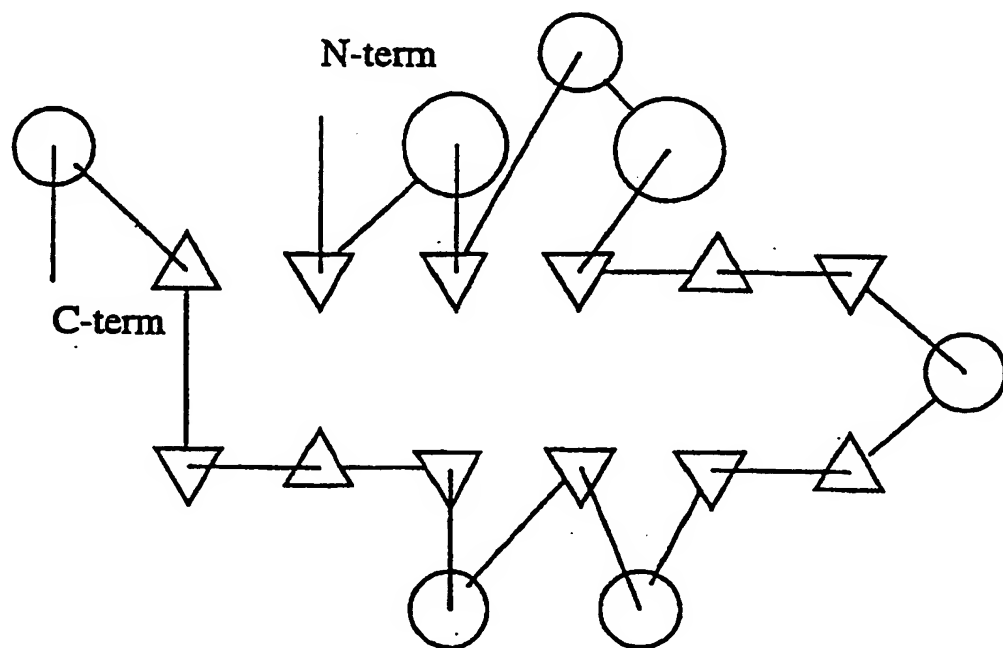
25 11. 前記混合溶液を放置する期間が 1 日～3 週間である、請求項 8 に記載の方法。

1 2. 前記デカルバミラーゼの溶液を与える工程の後に、該デカルバミラーゼ
 溶液をサイズ排除半透膜内に配置させる工程をさらに包含し、そして前記混合す
 る工程が、該半透膜を通して沈澱剤溶液を該デカルバミラーゼ溶液中に拡散させ
 5 ることを包含する、請求項 8 に記載の方法。

1 3. 前記混合する工程が、前記沈澱剤溶液を前記デカルバミラーゼ溶液に
 徐々に添加することを包含し、そして前記放置する工程が、得られる混合溶液を
 密閉容器内で放置することを包含する、請求項 8 に記載の方法。

1 4 以下の図に示すタンパク質立体構造トポロジーを有する立体構造により特
 徴付けられるデカルバミラーゼまたはその活性断片：

【化 1】

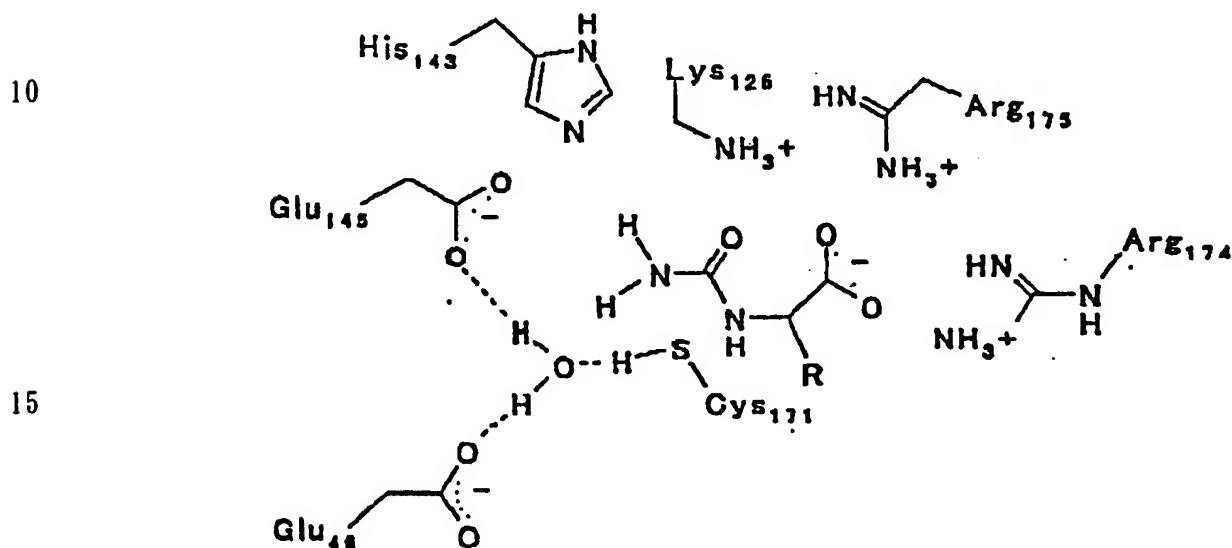


1 5. 4 本の α ヘリックスおよび 1 2 本の β ストランドを含む二次構造を含

む4層サンドイッチ構造を有する、デカルバミラーゼまたはその活性断片。

16. 酵素反応に関与するアミノ酸残基がシステイン1残基、グルタミン酸2残基、およびリジン1残基であり、酵素反応の基質がD-N-カルバモイル- α -アミノ酸であって、以下の図に示す基質結合様式を有する活性部位の立体構造により特徴付けられる、デカルバミラーゼまたはデカルバミラーゼ変異体、あるいはそれらの活性断片：

【化2】



ここで、置換基Rは、D-N-カルバモイル- α -アミノ酸の側鎖である。

17. D-N-カルバモイル- α -アミノ酸を基質とするデカルバミラーゼ活性を有する酵素分子であって、少なくとも、配列番号1または2における以下のアミノ酸：46位のGlu、126位のLys、145位のGlu、および171位のCys、に対応するアミノ酸から形成される活性部位腔を有する、酵素分子またはその活性断片。

18. 前記活性部位腔において、前記D-N-カルバモイル- α -アミノ酸が、反応時に前記配列番号1または2の126位のLys、143位のHis、145位のGlu、174位のArg、175位のArg、および197位のThrに対応するアミノ酸と相互作用し得る、請求項17に記載の酵素分子またはその活性断片。

19. 前記活性部位腔において、前記配列番号1または2の46位のGlu、145位のGlu、および171位のCysに対応するアミノ酸が水分子を介して水素結合している、請求項17または18に記載の酵素分子またはその活性断片。

20. 前記D-N-カルバモイル- α -アミノ酸が、D-N-カルバモイル-フェニルグリシン、D-N-カルバモイル-パラヒドロキシフェニルグリシン、D-N-カルバモイル-フェニルアラニン、D-N-カルバモイル-バリン、D-N-カルバモイル-アラニン、D-N-カルバモイル-システイン、D-N-カルバモイル-アスパラギン酸、D-N-カルバモイル-グルタミン酸、D-N-カルバモイル-グリシン、D-N-カルバモイル-ヒスチジン、D-N-カルバモイル-イソロイシン、D-N-カルバモイル-リジン、D-N-カルバモイル-ロイシン、D-N-カルバモイル-メチオニン、D-N-カルバモイル-アスパラギン、D-N-カルバモイル-プロリン、D-N-カルバモイル-グルタミン、D-N-カルバモイル-アルギニン、D-N-カルバモイル-セリン、D-N-カルバモイル-スレオニン、D-N-カルバモイル-トリプトファン、およびD-N-カルバモイル-チロシンからなる群から選択される、請求項16～19のいずれか1項に記載の酵素分子またはその活性断片。

25

21. 請求項14または15に記載のデカルバミラーゼの立体構造から分子

設計手法により構築された、デカルバミラーゼまたはその変異体あるいはそれらの活性断片とD-N-カルバモイル- α -アミノ酸あるいはD- α -アミノ酸との複合体立体構造により特徴付けられる、デカルバミラーゼ複合体。

5 2 2. デカルバミラーゼ変異体を設計する方法であって、デカルバミラーゼの請求項 1 4、1 6、または 2 1 のいずれか 1 項に記載の立体構造に基づいて物性および／または機能を改変したデカルバミラーゼ変異体を設計する工程を包含する、方法。

10 2 3. デカルバミラーゼ変異体を設計する方法であって、デカルバミラーゼ活性を有する酵素の結晶を生成する工程、該結晶のX線結晶構造解析により該結晶の立体構造を決定する工程、および決定した立体構造に基づいて物性および／または機能の向上したデカルバミラーゼ変異体を設計する工程を包含する、方法。

15 2 4. 前記立体構造が、請求項 1 4、1 6、または 2 1 のいずれか 1 項に記載のデカルバミラーゼの立体構造である、請求項 2 3 に記載の方法。

20 2 5. デカルバミラーゼ変異体を製造する方法であって、デカルバミラーゼ活性を有する酵素の結晶を生成する工程、該結晶のX線結晶構造解析により該結晶の立体構造を決定する工程、決定した立体構造に基づいて物性および／または機能の向上したデカルバミラーゼ変異体を設計する工程、および該デカルバミラーゼ変異体を産生する工程を包含する、方法。

25 2 6. 前記立体構造が、請求項 1 4、1 6、または 2 1 のいずれか 1 項に記載のデカルバミラーゼの立体構造である、請求項 2 5 に記載の方法。

27. 前記デカルバミラーゼ変異体を設計する工程が、酵素の基質特異性の変更、酵素比活性の変更、酵素の安定性向上、酵素の至適pHの最適化、および酵素の水溶性の変更からなる群から選択される1以上の酵素特性の改変を目的とする、請求項26に記載の方法。

5

28. 前記酵素特性の改変が、酵素の安定性向上を含む、請求項27に記載の方法。

10

29. 酵素の安定性向上に関する変異体の設計が、空気酸化による活性低下を招くアミノ酸残基を置換する変異を含む、請求項28に記載の方法。

30. 前記酵素特性の改変が、酵素比活性の変更および酵素の至適pHの最適化を含む、請求項27に記載の方法。

15

31. 請求項25～30のいずれか1項に記載の製造方法によって得られたデカルバミラーゼ変異体。

20

32. 請求項1～7のいずれか1項に記載のデカルバミラーゼ結晶の立体構造、あるいは請求項14, 16または21のいずれか1項に記載のデカルバミラーゼの立体構造を利用して、アミノ酸一次配列がデカルバミラーゼと類似する別のポリペプチド酵素またはタンパク質酵素を改変する方法。

33. コンピュータを用いて、デカルバミラーゼ変異体を設計するシステムであって、

25

デカルバミラーゼ活性を有する酵素の結晶の立体構造を、X線結晶構造解析により決定する手段、ならびに

決定した立体構造に基づいて物性および／または機能の向上したデカルバミラーゼ変異体を設計する手段を備えた、システム。

- 5 34. デカルバミラーゼ変異体の設計処理を実行させるためのプログラムを記録したコンピュータ読み取り可能な記録媒体であって、
該設計処理は、

デカルバミラーゼ活性を有する酵素の結晶のX線結晶構造解析により決定された該結晶のデータを入力する工程、ならびに

- 10 決定した立体構造に基づいて物性および／または機能の向上したデカルバミラーゼ変異体を設計する工程、
を包含する、記録媒体。

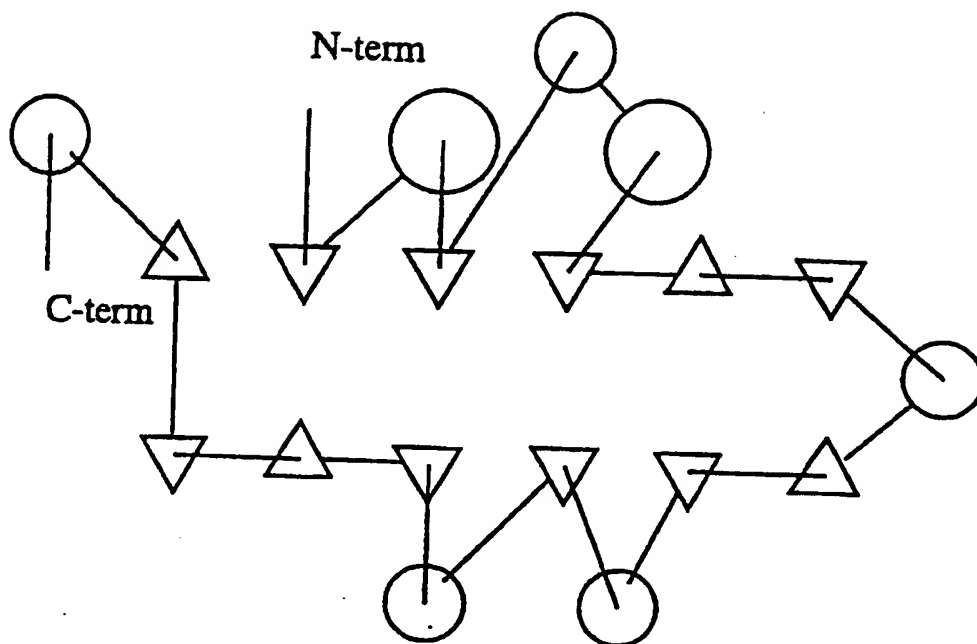
35. 以下の工程：

- 15 デカルバミラーゼ活性を有する酵素の結晶のX線結晶構造解析により決定された該結晶のデータを入力する工程、ならびに

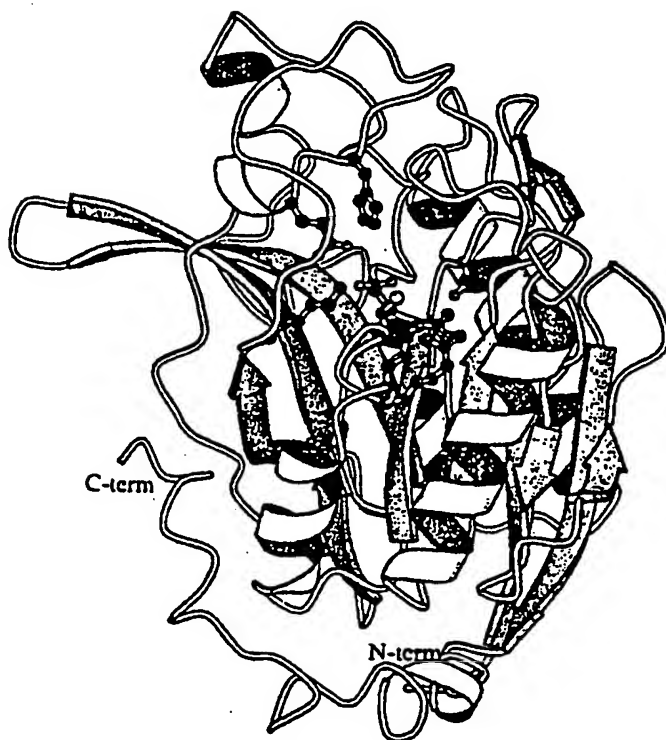
決定した立体構造に基づいて物性および／または機能の向上したデカルバミラーゼ変異体を設計する工程、

- 20 を包含する処理によって得られたデカルバミラーゼ変異体の立体構造を記述するデータを記録する、記録媒体。

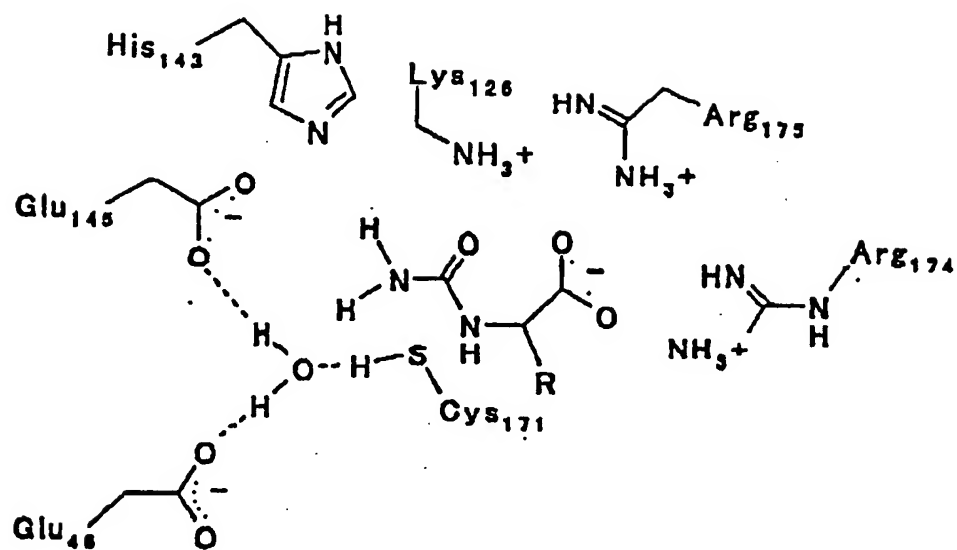
【図 1】



【図 2】



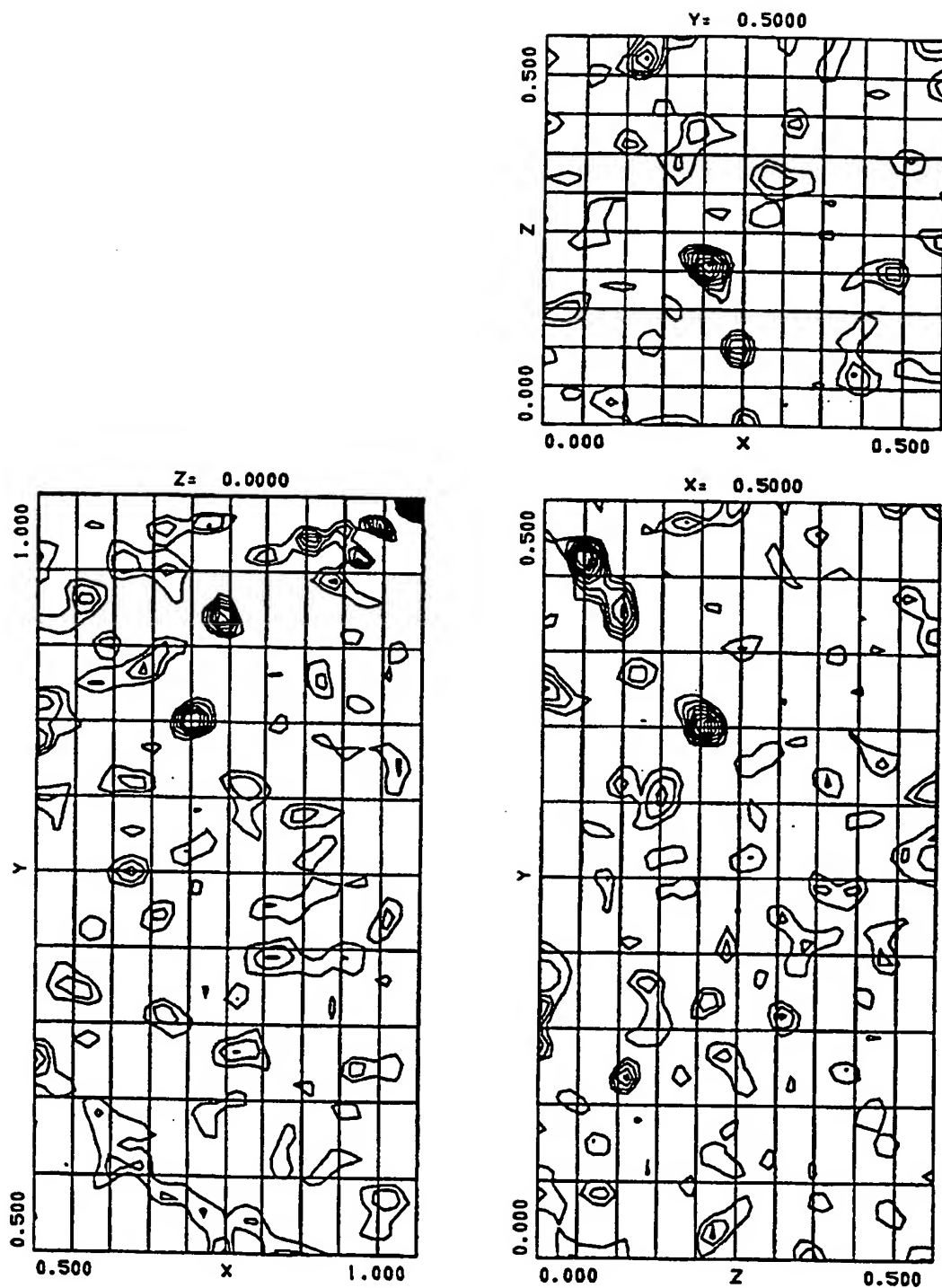
【図3】



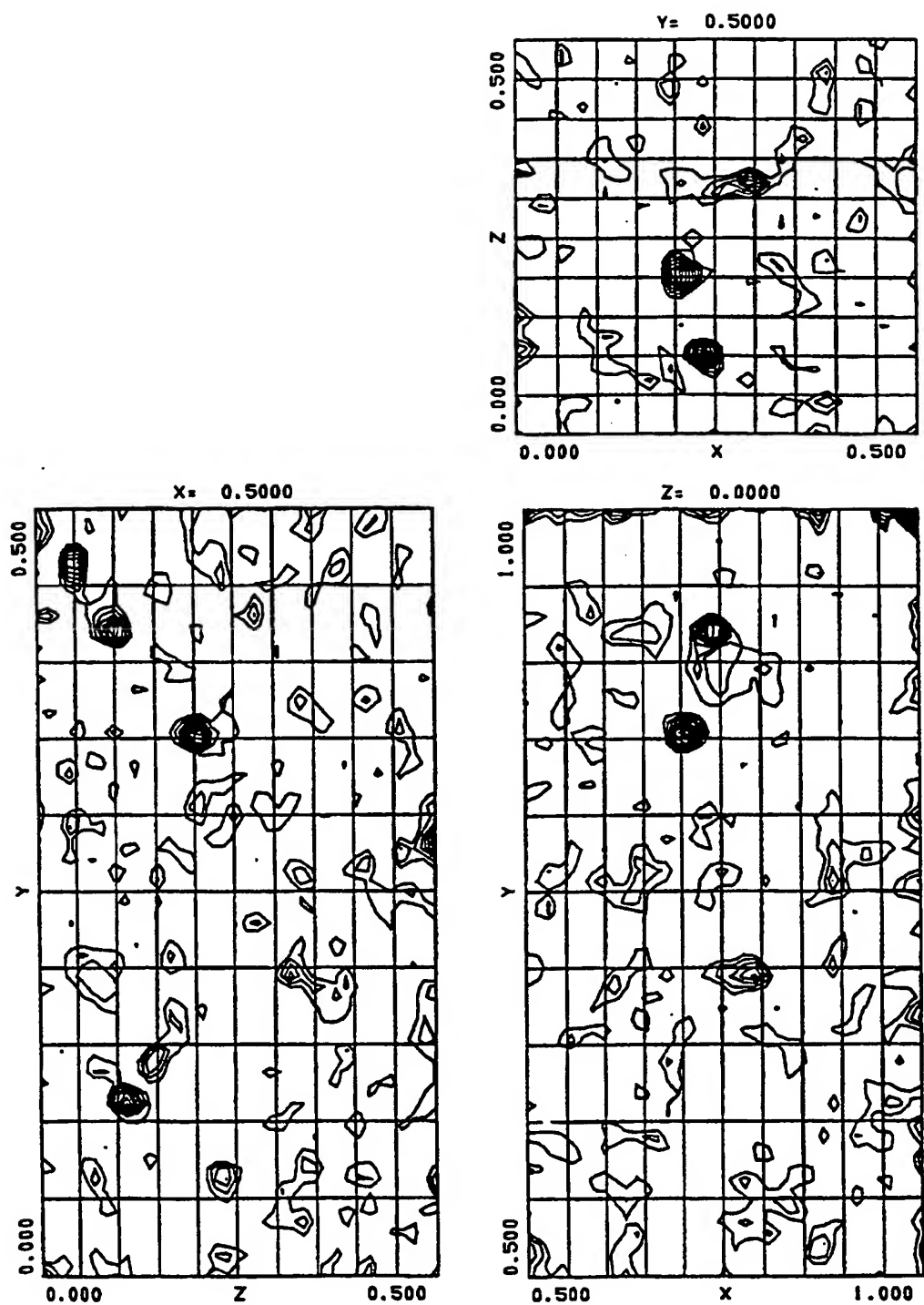
【図4】



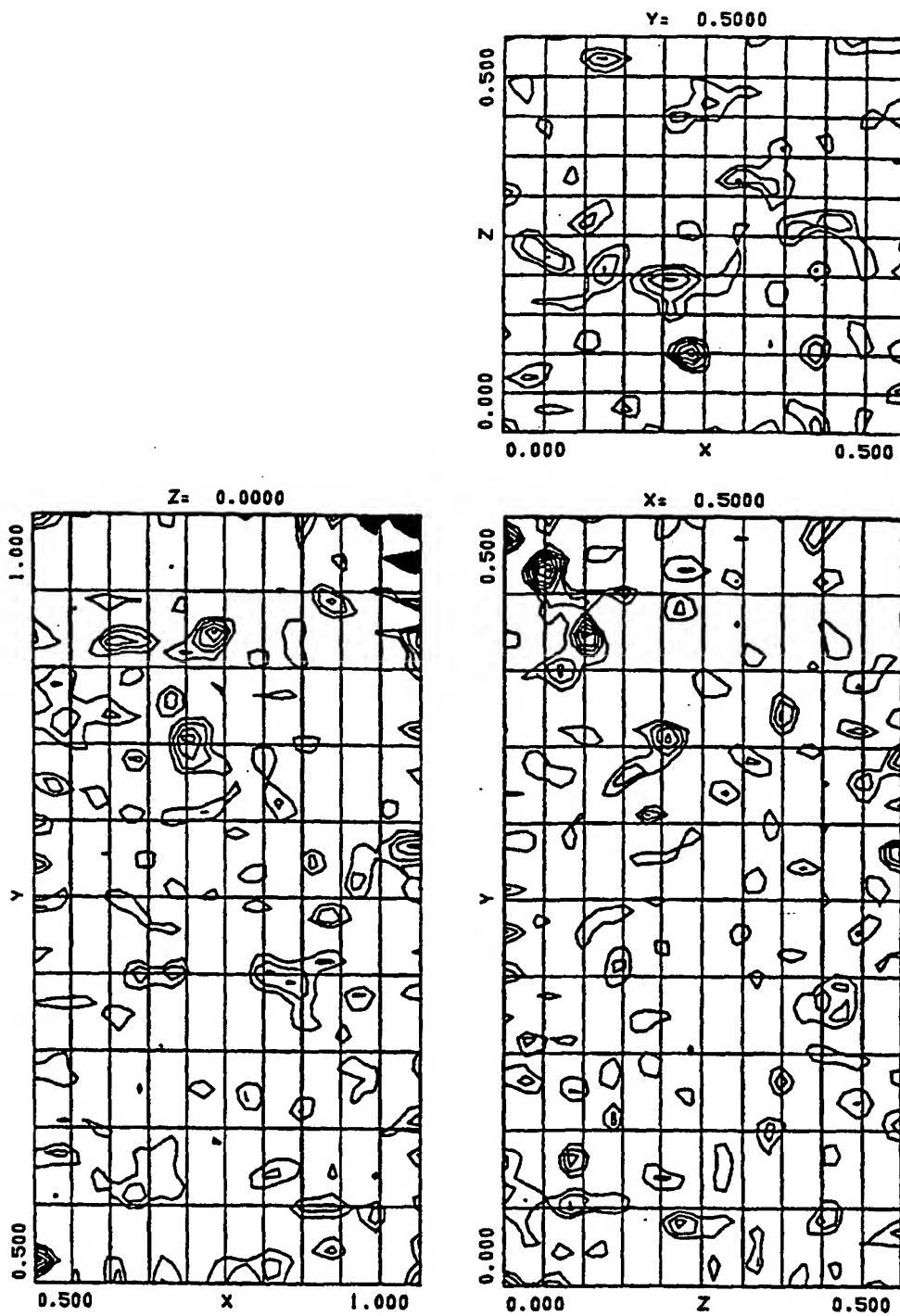
【図 5】



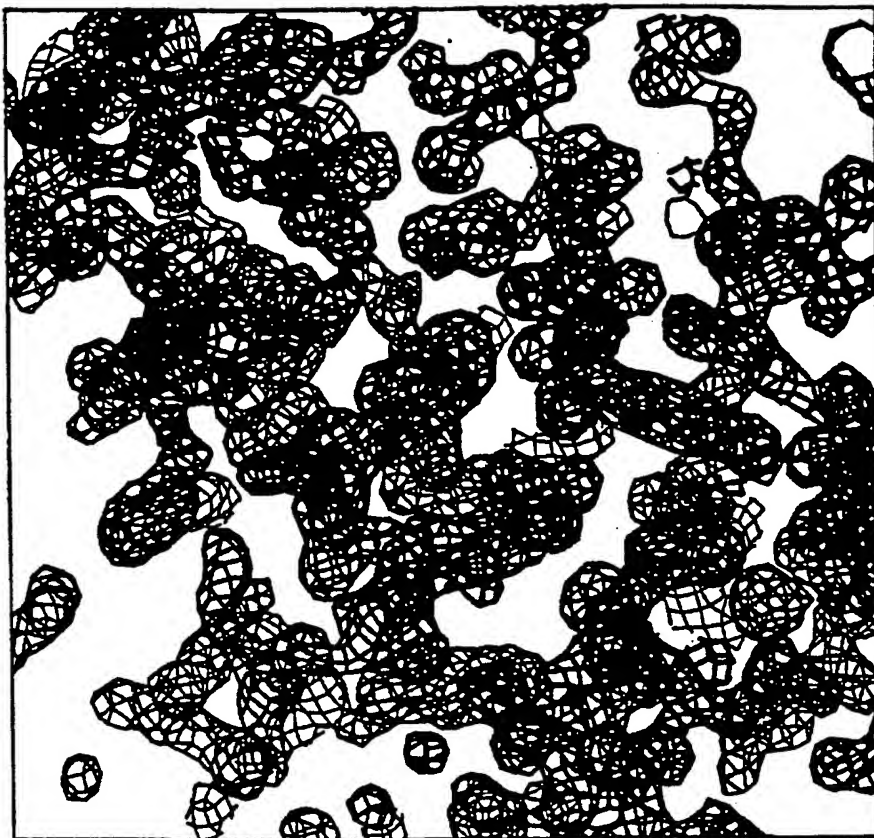
【図6】



【図 7】



【図 8】



【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Kaneka Corporation

<120> Three-dimensional structure of decarbamilase and the use thereof

<130> F5-00PCT217/KA022PCT

<140>ND

<141>2000-8-28

<150>JP11-246797

<151>1999-08-31

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 303

<212> PRT

<213> Agrobacterium sp.

<400> 1

Thr Arg Gln Met Ile Leu Ala Val Gly Gln Gln Gly Pro Ile Ala Arg
1 5 10 15

Ala Glu Thr Arg Glu Gln Val Val Val Arg Leu Leu Asp Met Leu Thr
20 25 30

Lys Ala Ala Ser Arg Gly Ala Asn Phe Ile Val Phe Pro Glu Leu Ala
35 40 45

Leu Thr Thr Phe Phe Pro Arg Trp His Phe Thr Asp Glu Ala Glu Leu
50 55 60

Asp Ser Phe Tyr Glu Thr Glu Met Pro Gly Pro Val Val Arg Pro Leu
65 70 75 80

Phe Glu Lys Ala Ala Glu Leu Gly Ile Gly Phe Asn Leu Gly Tyr Ala
85 90 95

Glu Leu Val Val Glu Gly Gly Val Lys Arg Arg Phe Asn Thr Ser Ile
100 105 110

Leu Val Asp Lys Ser Gly Lys Ile Val Gly Lys Tyr Arg Lys Ile His
115 120 125

Leu Pro Gly His Lys Glu Tyr Glu Ala Tyr Arg Pro Phe Gln His Leu
130 135 140

Glu Lys Arg Tyr Phe Glu Pro Gly Asp Leu Gly Phe Pro Val Tyr Asp
145 150 155 160

Val Asp Ala Ala Lys Met Gly Met Phe Ile Cys Asn Asp Arg Arg Trp
165 170 175

Pro Glu Ala Trp Arg Val Met Gly Leu Arg Gly Ala Glu Ile Ile Cys
180 185 190

Gly Gly Tyr Asn Thr Pro Thr His Asn Pro Pro Val Pro Gln His Asp
195 200 205

His Leu Thr Ser Phe His His Leu Leu Ser Met Gln Ala Gly Ser Tyr
210 215 220

Gln Asn Gly Ala Trp Ser Ala Ala Ala Gly Lys Val Gly Met Glu Glu
225 230 235 240

Asn Cys Met Leu Leu Gly His Ser Cys Ile Val Ala Pro Thr Gly Glu
245 250 255

Ile Val Ala Leu Thr Thr Thr Leu Glu Asp Glu Val Ile Thr Ala Ala
260 265 270

Val Asp Leu Asp Arg Cys Arg Glu Leu Arg Glu His Ile Phe Asn Phe
275 280 285

Lys Gln His Arg Gln Pro Gln His Tyr Gly Leu Ile Ala Glu Leu
290 295 300

<210> 2

<211> 303

<212> PRT

<213> E.coli

<400> 2

Thr Arg Gln Met Ile Leu Ala Val Gly Gln Gln Gly Pro Ile Ala Arg
1 5 10 15

Ala Glu Thr Arg Glu Gln Val Val Val Arg Leu Leu Asp Met Leu Thr
20 25 30

Lys Ala Ala Ser Arg Gly Ala Asn Phe Ile Val Phe Pro Glu Leu Ala
35 40 45

Leu Thr Thr Phe Phe Pro Arg Trp Tyr Phe Thr Asp Glu Ala Glu Leu
50 55 60

Asp Ser Phe Tyr Glu Thr Glu Met Pro Gly Pro Val Val Arg Pro Leu
65 70 75 80

Phe Glu Lys Ala Ala Glu Leu Gly Ile Gly Phe Asn Leu Gly Tyr Ala
85 90 95

Glu Leu Val Val Glu Gly Gly Val Lys Arg Arg Phe Asn Thr Ser Ile
100 105 110

Leu Val Asp Lys Ser Gly Lys Ile Val Gly Lys Tyr Arg Lys Ile His
115 120 125

Leu Pro Gly His Lys Glu Tyr Glu Ala Tyr Arg Pro Phe Gln His Leu
130 135 140

Glu Lys Arg Tyr Phe Glu Pro Gly Asp Leu Gly Phe Pro Val Tyr Asp
145 150 155 160

Val Asp Ala Ala Lys Met Gly Met Phe Ile Cys Asn Asp Arg Arg Trp
165 170 175

Pro Glu Ala Trp Arg Val Met Gly Leu Arg Gly Ala Glu Ile Ile Cys
180 185 190

Gly Gly Tyr Asn Thr Pro Thr His Asn Pro Glu Val Pro Gln His Asp
195 200 205

His Leu Thr Ser Phe His His Leu Leu Ser Met Gln Ala Gly Ser Tyr
210 215 220

Gln Asn Gly Ala Trp Ser Ala Ala Ala Gly Lys Ala Gly Met Glu Glu
225 230 235 240

Asn Cys Met Leu Leu Gly His Ser Cys Ile Val Ala Pro Thr Gly Glu
245 250 255

Ile Val Ala Leu Thr Thr Thr Leu Glu Asp Glu Val Ile Thr Ala Ala
260 265 270

Val Asp Leu Asp Arg Cys Arg Glu Leu Arg Glu His Ile Phe Asn Phe
275 280 285

Lys Gln His Arg Gln Pro Gln His Tyr Gly Leu Ile Ala Glu Leu
290 295 300

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05901

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl.⁷ C12N15/60, C12N9/88, G06F17/30

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl.⁷ C12N15/60, C12N9/88, G06F17/30

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST FILE (JOIS), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG),
MEDLINE (STN),
EMBL/DDBJ/Genbank/PIR/Swissprot/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	Structure Fold. Des., Vol.8[7] (July, 2000) T. Nakai et al., "Crystal structure of N-carbamyl-D-amino acid amidohydrolase with a novel catalytic framework common to amidohydrolases", pp.2991-3006	1-21, 31
X Y	Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr., Vol.55[Part3] (March, 1999) W. H. Hsu et al., "Expression, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of N-carbamyl-D-amino-acid amidohydrolase from Agrobacterium radiobacter", pp694-695	14-21 1-7, 22-34
X Y	WO, 94/03613, A1 (Kanegafuchi Chem. Ind. Co., Ltd.) 17 February, 1994 (17.02.94), Claims 37 (sequence Nos.1, 29) & EP, 610517, A1 & JP, 6-505186, A & CN, 1083528, A & US, 5824522, A & US, 6083752, A	14-21, 31 1-7, 22-30, 32-34
X	EP, 677584, A1 (Eniricerche S.P.A.) 18 October, 1995 (18.10.95) Claims & JP, 8-84584, A & DE, 69500108, B	31

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
29 November, 2000 (29.11.00)

Date of mailing of the international search report
12 December, 2000 (12.12.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05901

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	& ES, 2096494, B & US, 5807710, A & US, 5869298, A & IT, 1269321, B	
X	EP, 780473, A2 (Eniricerche S.P.A.) 25 June, 1997 (25.06.97), Claims & JP, 9-173068, A & US, 5877003, A & US, 5877002, A & IT, 1277125, B & KR, 97042446, A	31
X	FEMS Microbiol. Lett., Vol.145[1] (1996) A.Buson et al., "Identification, sequenceing and mutagenesis of the gene for a D-carboamoylase from Agrobacterium radiobacter", pp.55-62	31
Y	Protein Eng., Vol.8[10] (1995) N. Declerck et al., "Hyperthermostable mutants of Bacillus licheniformis α - amilase: multiple amino acid replacements and molecular modelling", pp.1029-1037	22-34
Y	AD Rep., [AD-A-210 096] (1989) C. O. Pabo, "Computer-Aided Design of Thermostable Proteins"	22-34

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05901

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The invention as set forth in claim 35 pertains to a recording medium carrying a record of the description of the stereostructure of decarbamylase variants and thus corresponds to mere presentation of information. Therefore, it relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The matter common to claims 1 to 34 resides in "decarbamylase crystal".
As stated in the document Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr., Vol. 55 [Part 3] (1999) p. 694-695, "decarbamylase crystal" had been publicly known prior to the present application. Thus, this common matter falls within the category of the prior art and therefore cannot be regarded as a special technical matter as specified in Rule 13.2 of the Regulations under the PCT.

Such being the case, the inventions as set forth in claims 1 to 34 are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept but considered as consisting of six groups of inventions, i.e., a group of the inventions of claims 1 to 7, a group of the inventions of claims 8 to 13, the invention of claim 14, the invention of claim 15, a group of the inventions of claims 16 to 20 and a group of the inventions of claims 21 to 34.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C12N15/60, C12N9/88, G06F17/30

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C12N15/60, C12N9/88, G06F17/30

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル(JOIS), WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG),
MEDLINE (STN),
EMBL/DDBJ/Genbank/PIR/Swissprot/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	Structure Fold. Des., Vol. 8[7] (2000-Jul) T. Nakai et al. "Crystal structure of N-carbamyl-D-amino acid amidohydrolase with a novel catalytic framework common to amidohydrolases" p. 2991-3006	1-21, 31
X Y	Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr., Vol. 55[Part3] (1999-Mar) W. H. Hsu et al. "Expression, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of N-carbamyl-D-amino-acid amidohydrolase from <i>Agrobacterium radiobacter</i> " p. 694-695	14-21 1-7, 22-34

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

29. 11. 00

国際調査報告の発送日

12.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上條 肇



4B

9453

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	WO, 94/03613, A1 (鐘淵化学工業株式会社) 17. 2月. 1994 (17. 02. 94) 請求項37 (配列番号1 及び配列番号29) 参照 &EP, 610517, A1 &JP, 6-505186, A &CN, 1083528, A &US, 5824522, A &US, 6083752, A	14-21, 31 1-7, 22-30, 32-34
X	EP, 677584, A1 (Eniricerche S.P.A.) 18. 10月. 1995 (18. 10. 95) 特許請求の範囲参照 &JP, 8-84584, A &DE, 69500108, B &ES, 2096494, B &US, 5807710, A &US, 5869298, A &IT, 1269321, B	31
X	EP, 780473, A2 (Eniricerche S.P.A.) 25. 6月. 1997 (25. 06. 97) 特許請求の範囲参照 &JP, 9-173068, A &US, 5877003, A &US, 5877002, A &IT, 1277125, B &KR, 97042446, A	31
X	FEMS Microbiol. Lett., Vol. 145[1] (1996) A. Buson et al. "Identification, sequenceing and mutagenesis of the gene for a D-carboamoylase from <i>Agrobacterium radiobacter</i> " p. 55-62	31
Y	Protein Eng., Vol. 8[10] (1995) N. Declerck et al. "Hyperthermostable mutants of <i>Bacillus licheniformis</i> α - amilase: multiple amino acid replacements and molecular modelling" p. 1029-1037	22-34
Y	AD Rep., [AD-A-210 096] (1989) C. O. Pabo "Computer-Aided Design of Thermostable Proteins"	22-34

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 35 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
請求の範囲35に係る発明はデカルバミラーゼ変異体の立体構造を記述したデータが記録された記録媒体に係るものであって、情報の単なる提示に該当するから、特許協力条約第17条(2)(a)(i)及び特許協力条約に基づく規則39.1(v)の規定によりこの国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときの国際調査機関は認めた。

特許請求の範囲第1-34項に共通の事項は「デカルバミラーゼ結晶」である。
ここで、「デカルバミラーゼ結晶」は文献Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr., Vol. 55[Part3] (1999) p. 694-695に記載されるように本出願前公知であると認められるから、当該共通事項は先行技術の域を出るものではなく、PCT規則13.2における特別な技術的事項であるとはいえない。
したがって、請求の範囲第1-34項に記載された発明は単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとはいえず、請求の範囲1-7, 8-13, 14, 15, 16-20, 21-34からなる6つの発明群からなるものであると認められる。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 0 0 0 9 4 1]

1. 変更年月日	1 9 9 0 年 8 月 2 7 日
[変更理由]	新規登録
住 所	大阪府大阪市北区中之島 3 丁目 2 番 4 号
氏 名	鐘淵化学工業株式会社

【書類名】 要約書

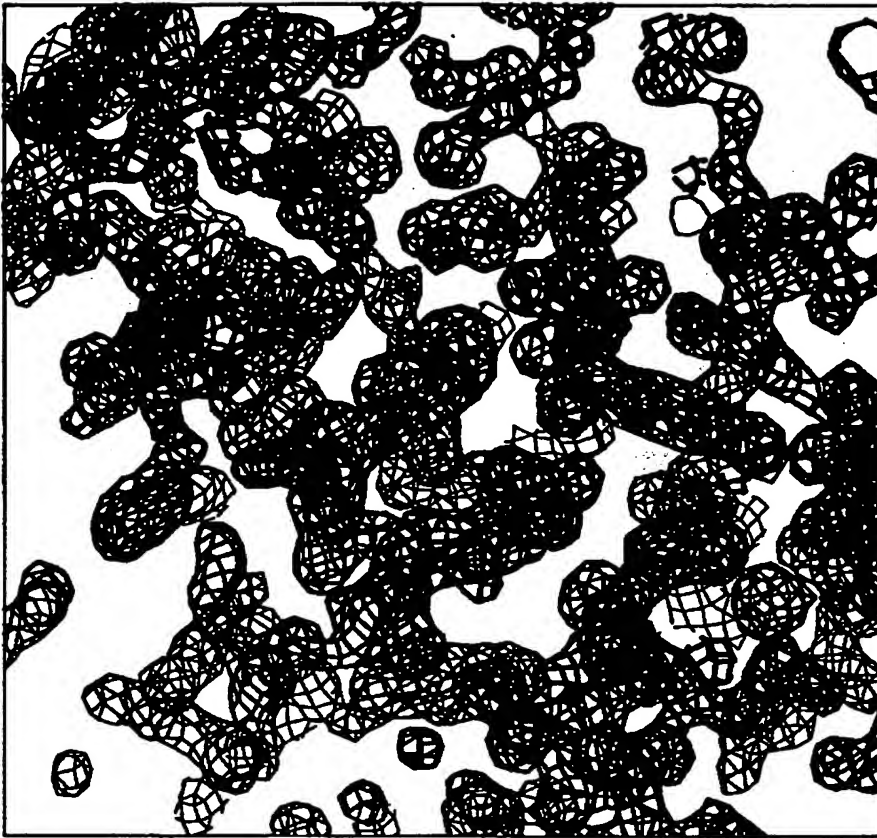
【要約】

【課題】 デカルバミラーゼのX線結晶構造解析によりその立体構造を明らかにし、その立体構造を利用して基質であるD-N-カルバモイル- α -アミノ酸類に対する反応性の向上等を目指した分子設計を行うことにより、工業利用により有利な優れたデカルバミラーゼ変異体を提供すること。

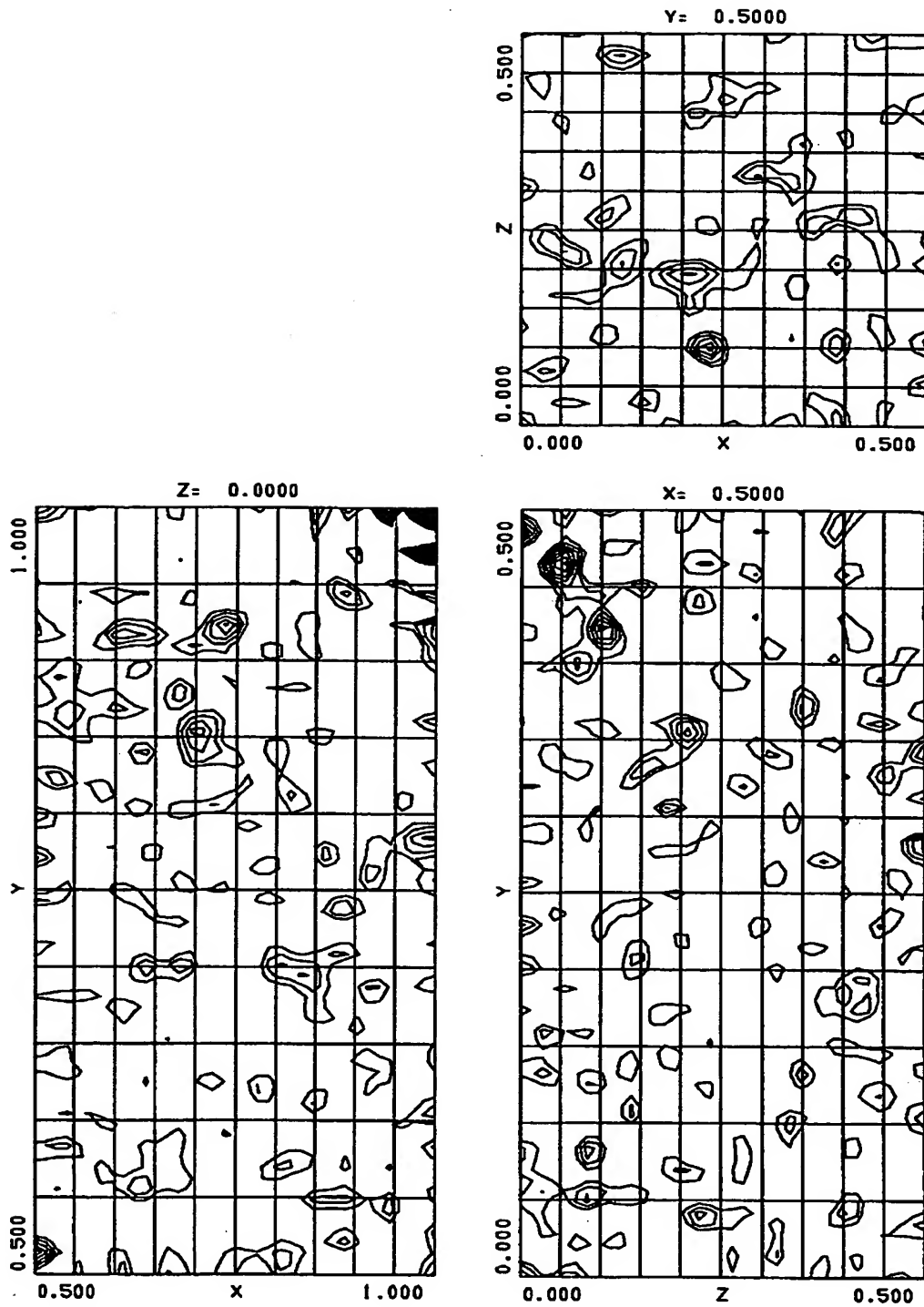
【解決手段】 X線結晶構造解析により決定したデカルバミラーゼの立体構造および変異体の立体構造モデルおよび基質、生成物等との複合体の立体構造モデル、およびこれら立体構造を利用した分子設計手法、およびこの方法を利用してデカルバミラーゼ変異体を得る方法、およびこの方法で得られたデカルバミラーゼ変異体、ならびにデカルバミラーゼと構造が類似するタンパク質の変異体を設計および製造する方法。

【選択図】 図2

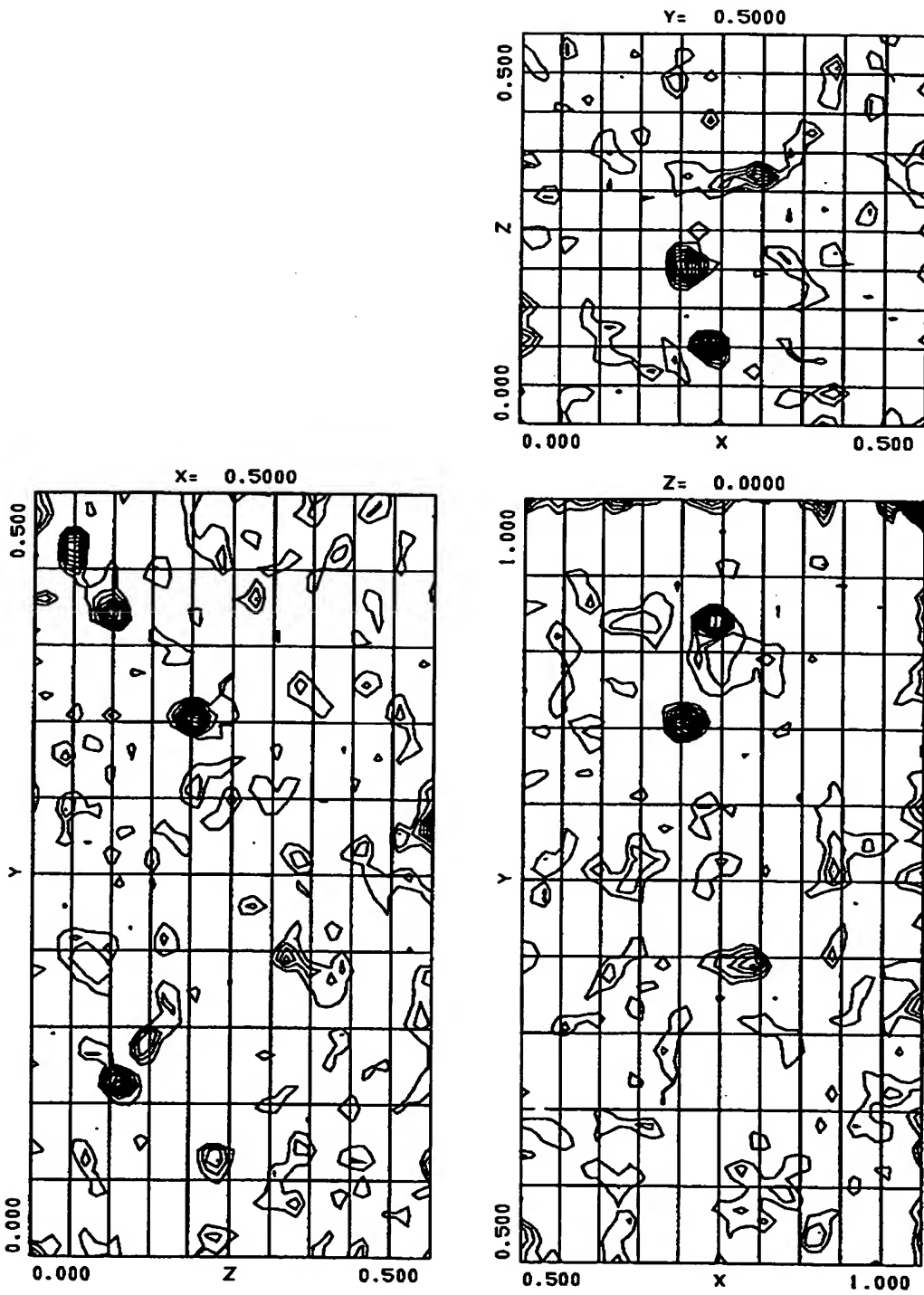
【図 8】



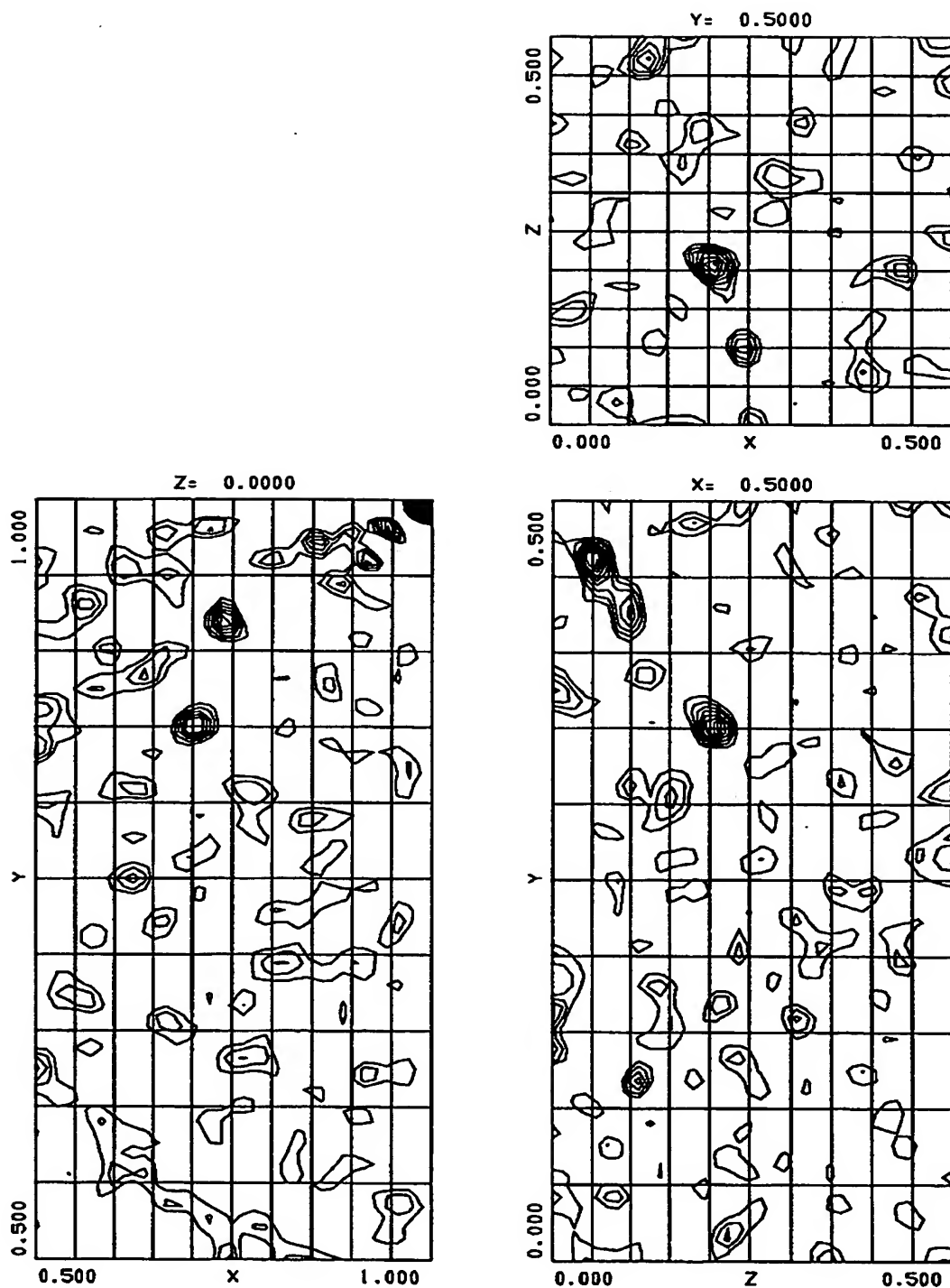
【図 7】



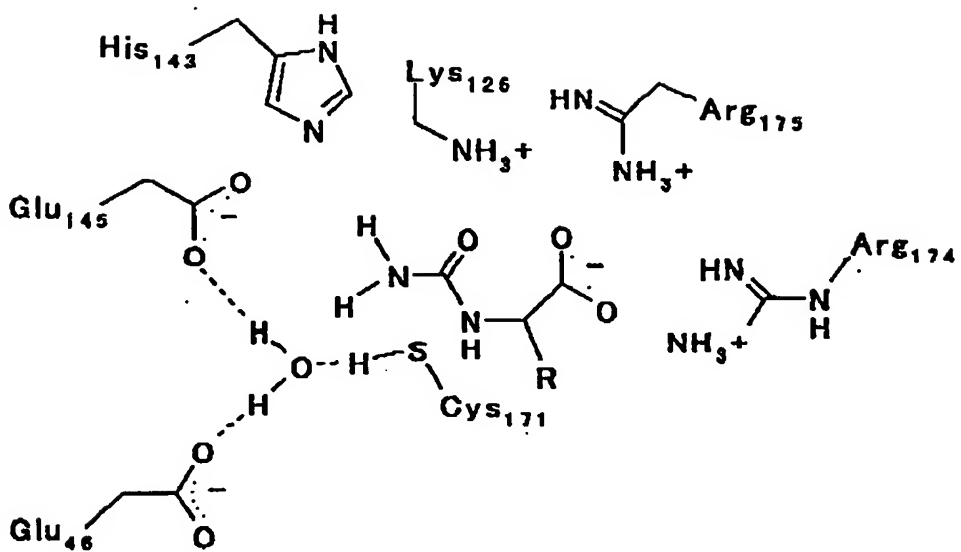
【図 6】



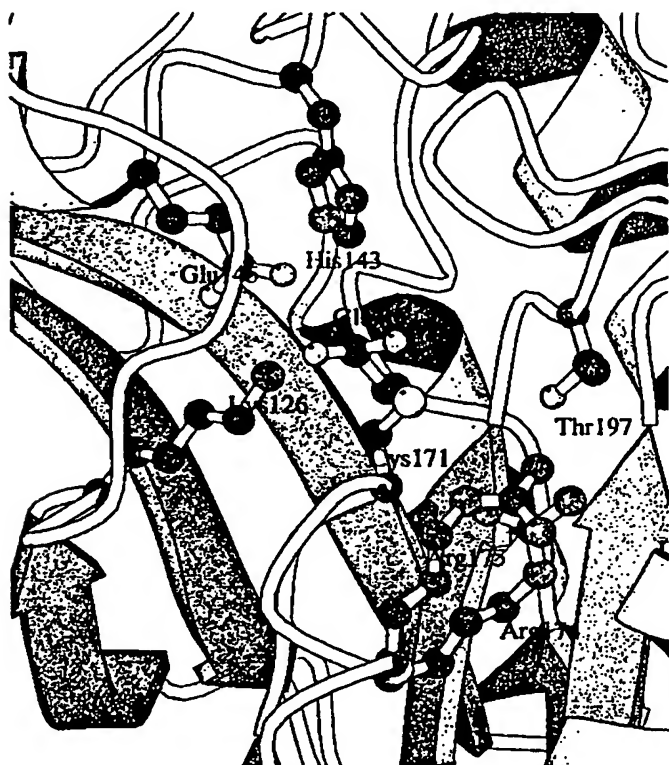
【図 5】



【図3】

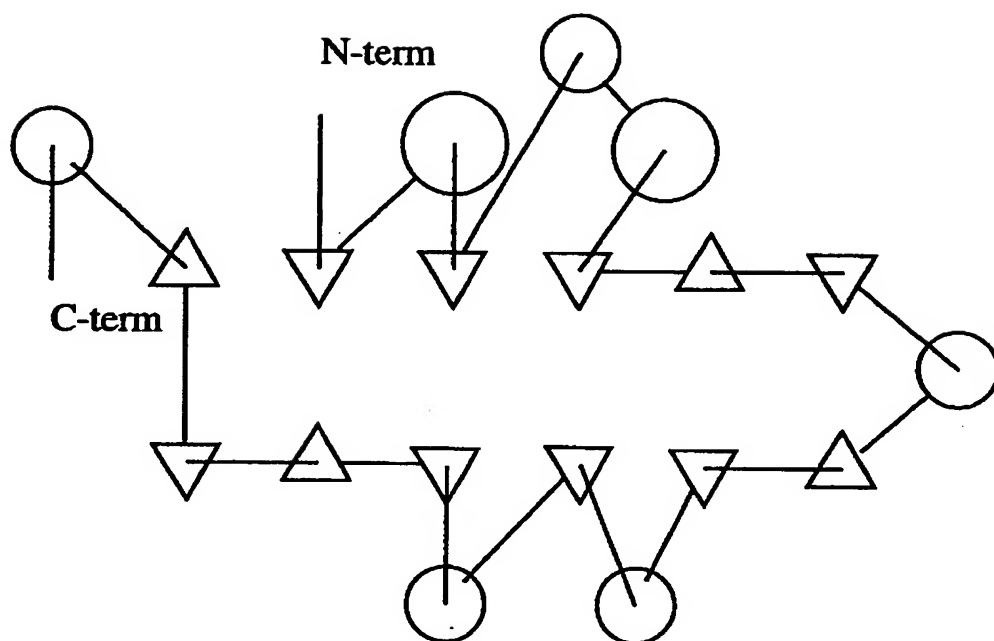


【図4】

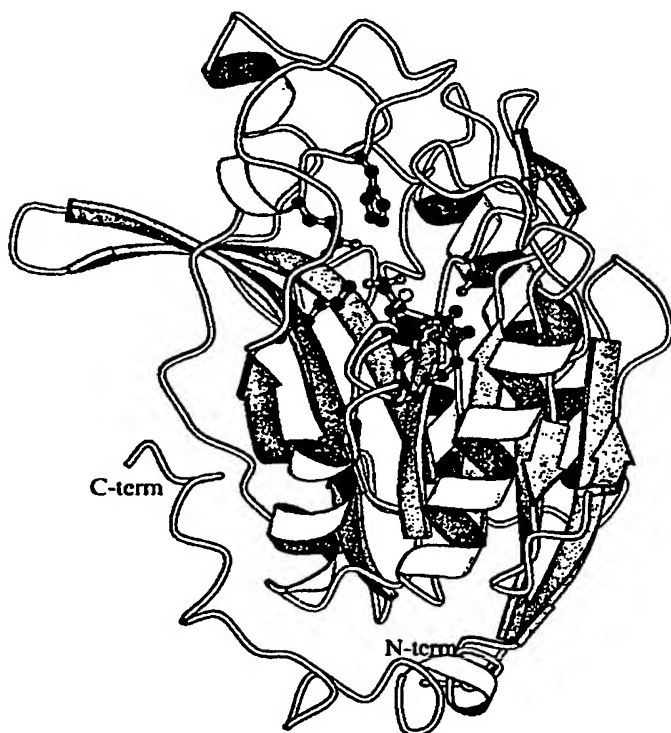


【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



Val Asp Leu Asp Arg Cys Arg Glu Leu Arg Glu His Ile Phe Asn Phe

275

280

285

Lys Gln His Arg Gln Pro Gln His Tyr Gly Leu Ile Ala Glu Leu

290

295

300

【図面の簡単な説明】

【図1】 デカルバミラーゼのタンパク質立体構造トポロジー図。 β ストランド構造を三角印で、 α ヘリックス構造を丸印で示した。「N-term」はアミノ末端を、「C-term」はカルボキシ末端を、それぞれ表す。

【図2】 デカルバミラーゼのリボースストランド図。 β ストランド構造を板状に、 α ヘリックス構造を螺旋で示した。触媒活性に関与するアミノ酸側鎖をボールスティック表記で示した。

【図3】 デカルバミラーゼの活性部位における基質結合様式の模式図。R-は、D- α -アミノ酸の側鎖である。残基番号および三文字表記によるアミノ酸名を示した。

【図4】 デカルバミラーゼの触媒活性部位の立体構造。 β ストランド構造を板状に、 α ヘリックス構造を螺旋で示し、触媒活性に関与するアミノ酸側鎖をボールスティック表記で表し、残基番号および三文字表記によるアミノ酸名を示した。

【図5】 1.00 Åおよび0.98 Åの回折データから計算した差パターン図のハーカー面。

【図6】 1.00 Åおよび1.27 Åの回折データから計算した差パターン図のハーカー面。

【図7】 0.98 Åをアノマラス (anomalous) データとして計算したアノマラス差パターン図のハーカー面。

【図8】 本発明の立体構造を示す、触媒活性部分の代表的な電子密度図。

Leu Val Asp Lys Ser Gly Lys Ile Val Gly Lys Tyr Arg Lys Ile His
115 120 125

Leu Pro Gly His Lys Glu Tyr Glu Ala Tyr Arg Pro Phe Gln His Leu
130 135 140

Glu Lys Arg Tyr Phe Glu Pro Gly Asp Leu Gly Phe Pro Val Tyr Asp
145 150 155 160

Val Asp Ala Ala Lys Met Gly Met Phe Ile Cys Asn Asp Arg Arg Trp
165 170 175

Pro Glu Ala Trp Arg Val Met Gly Leu Arg Gly Ala Glu Ile Ile Cys
180 185 190

Gly Gly Tyr Asn Thr Pro Thr His Asn Pro Glu Val Pro Gln His Asp
195 200 205

His Leu Thr Ser Phe His His Leu Leu Ser Met Gln Ala Gly Ser Tyr
210 215 220

Gln Asn Gly Ala Trp Ser Ala Ala Ala Gly Lys Ala Gly Met Glu Glu
225 230 235 240

Asn Cys Met Leu Leu Gly His Ser Cys Ile Val Ala Pro Thr Gly Glu
245 250 255

Ile Val Ala Leu Thr Thr Thr Leu Glu Asp Glu Val Ile Thr Ala Ala
260 265 270

<210> 2

<211> 303

<212> PRT

<213> E.coli

<400> 2

Thr Arg Gln Met Ile Leu Ala Val Gly Gln Gln Gly Pro Ile Ala Arg

1 5 10 15

Ala Glu Thr Arg Glu Gln Val Val Val Arg Leu Leu Asp Met Leu Thr

20 25 30

Lys Ala Ala Ser Arg Gly Ala Asn Phe Ile Val Phe Pro Glu Leu Ala

35 40 45

Leu Thr Thr Phe Phe Pro Arg Trp Tyr Phe Thr Asp Glu Ala Glu Leu

50 55 60

Asp Ser Phe Tyr Glu Thr Glu Met Pro Gly Pro Val Val Arg Pro Leu

65 70 75 80

Phe Glu Lys Ala Ala Glu Leu Gly Ile Gly Phe Asn Leu Gly Tyr Ala

85 90 95

Glu Leu Val Val Glu Gly Gly Val Lys Arg Arg Phe Asn Thr Ser Ile

100 105 110

Glu Lys Arg Tyr Phe Glu Pro Gly Asp Leu Gly Phe Pro Val Tyr Asp
145 150 155 160

Val Asp Ala Ala Lys Met Gly Met Phe Ile Cys Asn Asp Arg Arg Trp
165 170 175

Pro Glu Ala Trp Arg Val Met Gly Leu Arg Gly Ala Glu Ile Ile Cys
180 185 190

Gly Gly Tyr Asn Thr Pro Thr His Asn Pro Pro Val Pro Gln His Asp
195 200 205

His Leu Thr Ser Phe His His Leu Leu Ser Met Gln Ala Gly Ser Tyr
210 215 220

Gln Asn Gly Ala Trp Ser Ala Ala Ala Gly Lys Val Gly Met Glu Glu
225 230 235 240

Asn Cys Met Leu Leu Gly His Ser Cys Ile Val Ala Pro Thr Gly Glu
245 250 255

Ile Val Ala Leu Thr Thr Thr Leu Glu Asp Glu Val Ile Thr Ala Ala
260 265 270

Val Asp Leu Asp Arg Cys Arg Glu Leu Arg Glu His Ile Phe Asn Phe
275 280 285

Lys Gln His Arg Gln Pro Gln His Tyr Gly Leu Ile Ala Glu Leu
290 295 300

<400> 1

Thr Arg Gln Met Ile Leu Ala Val Gly Gln Gln Gly Pro Ile Ala Arg

1 5 10 15

Ala Glu Thr Arg Glu Gln Val Val Val Arg Leu Leu Asp Met Leu Thr

20 25 30

Lys Ala Ala Ser Arg Gly Ala Asn Phe Ile Val Phe Pro Glu Leu Ala

35 40 45

Leu Thr Thr Phe Phe Pro Arg Trp His Phe Thr Asp Glu Ala Glu Leu

50 55 60

Asp Ser Phe Tyr Glu Thr Glu Met Pro Gly Pro Val Val Arg Pro Leu

65 70 75 80

Phe Glu Lys Ala Ala Glu Leu Gly Ile Gly Phe Asn Leu Gly Tyr Ala

85 90 95

Glu Leu Val Val Glu Gly Gly Val Lys Arg Arg Phe Asn Thr Ser Ile

100 105 110

Leu Val Asp Lys Ser Gly Lys Ile Val Gly Lys Tyr Arg Lys Ile His

115 120 125

Leu Pro Gly His Lys Glu Tyr Glu Ala Tyr Arg Pro Phe Gln His Leu

130 135 140

【 0 0 9 4 】

【発明の効果】

本発明によれば、デカルバミラーゼおよびデカルバミラーゼ変異体の立体構造および変異体の立体構造モデルが提供される。本酵素の立体構造は、耐熱性、有機溶剤耐性、空気酸化に対する耐性等の安定性、酵素反応の至適 pH の変更および比活性向上に関するアミノ酸変異の合理的な分子設計に有用である。このことによって、工業利用に有利な改変酵素を迅速かつ効率的に取得することが可能となる。さらには、本酵素の立体構造が類縁関係にあるアミダーゼまたはニトリラーゼなどの酵素群の中で唯一決定されたものであり、これら酵素群の工業利用分野で有意義に応用され得ることは明らかである。

【 0 0 9 5 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Kaneka Corporation

<120> Three-dimensional structure of decarbamilase and the use thereof

<130> J199247416

<140>ND

<141>1999-08-31

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 303

<212> PRT

<213> Agr bacterium sp.

pH 7.0 付近でヒスチジンが正電荷を持った場合、139位のアルギニンとの静電的な反発により、主鎖の歪みを解消することによる安定化の寄与分を減じたためと考えられる。

【0091】

計算により求めた203位の最適アミノ酸変異の安定性の順位は、実験により求めた変性温度の向上の大きさと完全には一致しないが、いずれも天然型デカルバミラーゼのプロリン残基よりも構造エネルギーの低い（安定な）方から数えて上位に位置し、実験結果とよく一致した。

【0092】

【表4】

203位のアミノ酸変異による熱安定性の変化

変異株	変異部位	アミノ酸変異	変性温度 (°C)	ΔT_m
404	Pro203	Leu	68.0	6.2
406	Pro203	Ser	66.5	4.7
429	Pro203	Glu	70.0	8.2
445	Pro203	Thr	67.5	5.7
468	Pro203	Ala	67.7	5.9
469	Pro203	Ile	67.2	5.4
470	Pro203	His	65.2	3.4

【0093】

変性温度は、上記のように調製した（粗）酵素液を各温度にて10分間の熱処理、熱変性による不溶物を除去した後の活性を測定し、残存比活性50%を示す温度と定義する。残存比活性の測定は以下のように行った。1.0重量%になるようにN-カルバモイル-D- α -パラヒドロキシフェニルグリシンを0.1Mリン酸緩衝液pH 7.0に溶解した基質溶液1mlに、酵素溶液0.1mlを加え、40℃、20分間反応させ、20%トリクロロ酢酸0.25mlを添加して酵素反応を停止させた後、活性を変換されたD- α -パラヒドロキシフェニルグリシンを内部標準としてD-フェニルアラニンを用いて高速液体クロマトグラフィーにより定量することにより算出した。変異株は、スクリーニングで得られた変異株の識別番号を示す。 ΔT_m は、変異前のデカルバミラーゼの変性温度からの差異を示す。

(実施例 7) デカルバミラーゼの安定化設計

デカルバミラーゼの安定化設計の一例として、エネルギー的に不利なアミノ酸残基を変異することにより安定性の向上が見られた例を示す。本発明の立体構造から計算した 203 位のプロリン、Pro 203 の主鎖二面角 ($\phi = -60^\circ$ 、 $\psi = -44^\circ$) は、 α ヘリックス構造に特徴的な二面角を有している。一般にプロリン残基は、ヘリックス構造を不安定化する、あるいは壊す残基として働くことが知られている。デカルバミラーゼの 203 位にプロリンが存在することで、主鎖構造に歪みを生じ、構造を不安定化すると推定される。この部位は、ヘリックス構造に特徴的な二面角を有することから、ヘリックス構造に適したアミノ酸残基に置換することにより、天然状態の構造エネルギーを安定化しうる。例えば、 α ヘリックス構造を取りやすいアミノ酸残基として、アラニン (Ala)、グルタミン酸 (Glu)、ロイシン (Leu)、セリン (Ser) などに置換しうる。203 位のアミノ酸を天然型 20 種類のアミノ酸に変異し、それぞれの構造については、AMBER のポテンシャルパラメーター (Weiner, P. A. ら, J. Comp. Chemistry 7 (2) : 230-252, 1986) により構造エネルギーを算出し、構造エネルギー値の低いアミノ酸変異がより望ましい変異であるとして、この部位での最適アミノ酸変異を求めた。その結果、アスパラギン酸 > スレオニン > セリン > バリン > グルタミン酸 > イソロイシン > アラニン > フェニルアラニン > チロシン > ロイシン > ヒスチジン > アスパラギン > グルタミン > システイン > プロリンとなった。実施例 1 で調製したアミノ酸変異体の変性温度を表 4 に示す (国際公開番号 WO 94/03613)。以下のいずれの変異においても、安定性の向上 ($\Delta T_m = 3.4 \sim 8.2^\circ\text{C}$) が認められる。これらは、プロリン以外のアミノ酸に変異したことで、主鎖構造の歪みを解消したと考えるのが妥当である。また、グルタミン酸 ($\Delta T_m = 8.2^\circ\text{C}$) に変異したものが最も高い安定性を示すが、これはグルタミン酸への変異により、グルタミン酸の側鎖カルボキシル基が近傍にある 139 位のアルギニン側鎖のグアニジノ基とイオン結合あるいは水素結合を形成することができ、新たに加わった相互作用の寄与として他の変異体に比べ高い安定性を示すと考えられる。His 変異体の安定性の増加が、 $\Delta T_m = 3.4^\circ\text{C}$ と他の変異体に比べて小さいのは、

図からマスクと呼ばれるタンパク質の分子が存在する領域を同定した。求めた非結晶学的対称マトリックスおよびマスクを用いて、プログラムDMを用いてNC S平均化計算を行った。その結果、2分子間の相関係数は、0.92と高い相関を示し、自由R因子(free R-factor)は24.5%であった。改良された電子密度図は極めて明瞭(例えば、図8を参照のこと。図8において、ペプチド主鎖のつながりが連続した電子密度として観察され、図中央には46位のGlu、171位のCys、および145位のGluと同定されるアミノ酸側鎖に対応する電子密度が観察される。)で、 α ヘリックスまたは β シートなどの二次構造部分はアミノ酸の主鎖の流れを明確に追うことができ、また芳香族アミノ酸側鎖などの電子密度も明瞭であった。

【0089】

(実施例6) デカルバミラーゼの立体構造モデルの構築および精密化

実施例5で得られた電子密度図からプログラムオー(O)(Uppsala University)を用いて、3次元グラフィックス上でデカルバミラーゼの立体構造モデルを組み立てた。電子密度をアミノ酸配列に対応させるため、まず、トリプトファン残基など特徴的な電子密度を有する部分アミノ酸配列に相当する電子密度を電子密度図上で見出し、アミノ酸配列を参照しながら電子密度に適合するアミノ酸残基の部分構造をプログラムOを用いて構築し、順次この作業を繰り返すことにより、デカルバミラーゼのすべてのアミノ酸残基(303残基)を相当する電子密度に適合させ、分子全体の初期立体構造モデルを構築した。得られた立体構造モデルを出発モデル構造として、立体構造精密化プログラムであるXPLOの精密化プロトコル(XPLOマニュアル、Yale University)に従って立体構造の精密化を行った。精密化は、電子密度図からのずれの大きい局所構造の修正および水分子に相当する電子密度を同定し精密化計算に水分子を含める操作を繰り返し、R値および自由R値(free R-factor)を指標に精密化を進めた。水分子を加えたネイティブ結晶における最終モデル構造のR値は、500-1.7Å分解能の反射データに対して、19.6%であった。

【0090】

、その座標を求めた。確認は、まず、水銀 1 のみの座標を用いて位相を計算し、その位相を使って差フーリエ計算から水銀 2 の座標を計算し、水銀 2 の自己ピークおよび水銀 1 - 水銀 2 の交差ピークが差パターン図に存在するかどうかで判定することにより行った。これら以外に結合した水銀原子の位置を見いだすために、水銀 1 および 2 の座標を用いて重原子位置パラメータの精密化および位相計算を行い、差フーリエ計算によりその位置を求め、水銀 2 を同定した場合と同様に自己ピークおよび交差ピークの確認を行った。その結果、さらに 4 個の水銀原子に相当する自己ピークおよび交差ピークを確認することができ、水銀 3、水銀 4、水銀 5 および水銀 6 の座標を決定した。

【0088】

波長 1.00 Å で測定した 1.8 Å 分解能の EMTS 誘導体結晶のデータを用いて、求めた 6 個の水銀原子座標（重原子パラメータ）をプログラム MLPHARE (CCP4 パッケージ) (SERC) を用いて精密化し、初期位相を決定した。精密化後のフィギュア・オブ・メリット (figure of merit) の平均値は 0.50 であった。その後、プログラム DM (CCP4 パッケージ、SERC) を用いた溶媒平滑化法およびヒストグラムマッチング法をデカルバミラーゼ結晶中の溶媒領域を 35% として低分解能から高分解能まで徐々に位相を拡張することで初期位相の改良を行った。また、デカルバミラーゼの結晶は、結晶の密度測定の結果から非対称単位中に 2 分子が含まれることがわかっており、非結晶学的な対称を利用して、NCS 平均化と呼ばれる電子密度の平均化を行うことにより位相改良を行った。まず、この方法を適用するために、デカルバミラーゼ結晶中の非結晶学的な 2 回軸の決定を行った。溶媒平滑化法を適用した後の位相を用いて電子密度図を計算し、3 次元グラフィックス上で重原子位置および電子密度図を表示し、水銀原子の座標間の midpoint を結んだ 2 本の線が Z 軸（結晶学的な 2 回軸の 1 つ）上で直行していることがわかった。したがってデカルバミラーゼ分子は、この 2 本の非結晶学的な 2 回軸および結晶学的な 2 回軸の計 3 本が (222) の対称を持っていると推定された。電子密度図の各セクションを詳細に観察し、それぞれ 2 分子の中心座標を決定し、並進および回転を含む非結晶学的対称マトリックスを算出した。同時に溶媒平滑化法で得られた電子密度

【表 2】

デカルバミラーゼの E M T S 誘導体結晶の回折データの処理結果

波 長 (Å)	分 解 能 (Å)	R-merge (%)	収 率 (%)	独立反射数	単位胞定数 (Å)
0.98	1.8	5.1	98.5	56679	a=66.92 b=135.50 c=67.30
1.00	1.8	4.7	98.5	57493	a=67.23 b=136.13 c=67.65
1.27	2.0	5.8	86.5	36870	a=67.13 b=136.00 c=67.54

R-mergeは、複数測定した各フレーム間の誤差を表している。

【0 0 8 6】

【表 3】

デカルバミラーゼのネイティブ結晶の回折データの処理結果

波長 (Å)	分解能 (Å)	R-merge (%)	収率 (%)	独立反射数	格子定数 (Å)
0.93	1.7	6.4	96.1	68596	a=67.84 b=137.83 c=68.39

R-mergeは、複数測定した各フレーム間の誤差を表している。

【0 0 8 7】

(実施例 5) 重原子座標の決定および位相改良

E M T S 誘導体結晶について測定した 3 波長の回折データのうち 1.00 Å のデータをネイティブ結晶のデータと仮定して 0.98 Å をアノマラス (a n o m a l o u s)、1.27 Å をアイソモルファス (i s o m o r p h o u s) データとして、差パターソン関数およびアノマラス差パターソン関数を計算し、そのハーカー面 (差パターソン図と呼ばれる。図 5 ~ 図 7) を描き、ハーカー面上の強度の強いピーク位置とそのクロスベクトルに相当する顕著なピーク位置から重原子位置の同定を試みた。各のハーカー面で強度の強いパターソンピークを 2 つの差パターソン図 (1.00 - 0.98 Å のデータ間および 1.00 - 1.27 Å のデータ間) から選び出し、2 つの水銀原子 (水銀 1 および水銀 2) を同定し

ザーバー溶液として密封した後、蒸気拡散法により20～25℃で結晶化を行った。結晶化開始後、約2日から二週間程度で0.3×0.3×0.1mm～0.6×0.6×0.3mmの寸法にまで結晶が成長した。

【0082】

(実施例2) デカルバミラーゼの重原子誘導体結晶の調製

実施例1で得られたネイティブ結晶を顕微鏡下、液滴台上の小滴より取り出し、水銀化合物の一つであるEMTS（エチル水銀チオサリチル酸ナトリウム塩）濃度を0.5～1.0mMに調製した20重量%ポリエチレングリコール6000（ナカライテスク製）、0.2M塩化リチウムを含む0.1M HEPES緩衝液（pH7.5）に終夜浸漬させることにより重原子誘導体を調製した。

【0083】

(実施例3) デカルバミラーゼ結晶の凍結

実施例1および2で調製したデカルバミラーゼのネイティブ結晶および重原子誘導体結晶を、グリセロール等の凍結安定化剤を添加することなく、結晶化液滴から取り出し、直接液体窒素に浸漬して瞬間凍結した。

【0084】

(実施例4) デカルバミラーゼ結晶のX線回折データの収集

多波長異常分散法による解析を行うため、放射光施設Spring-8で回折データ測定を行った。測定には、液体窒素中で凍結したEMTS誘導体結晶を用いて行った。測定は、水銀の異常分散を考慮した3波長（0.98、1.00、1.27Å）で行った。3波長の回折データはすべて1個の結晶から収集することできた。測定した53フレーム分の回折画像データをデータ処理プログラムDENZO（McScience）にて処理した結果を表2に示した。デカルバミラーゼのネイティブ結晶については、1.00Å波長を用いて凍結状態で回折データ測定を行い、その処理結果を表3に示した。なお、独立反射数、単位格子定数または格子定数などの用語についてはX線解析入門（角戸正夫ら、東京化学同人）を参照のこと。

【0085】

バー (Geneva University Hospital and University of Geneva, Geneva, Switzerland) および MacVector 6.0 (帝人システムテクノロジー)。

【0077】

本発明に従って、上記方法を利用して得られた、デカルバミラーゼのアミノ酸配列に類似するポリペプチド酵素またはタンパク質酵素の変異体が提供され得る。これらの酵素の変異体は、その野生型酵素に代えて、例えばバイオリアクターなどで、使用され得る。

【0078】

本発明に従って、デカルバミラーゼなどの上記分子の立体構造の3次元座標データおよび／または分子設計手法および／または改変方法のプログラムを記録した電磁気記憶媒体もまた提供され得る。電磁気媒体としては、例えば、磁気テープ、磁気ディスク、光磁気ディスク、光ディスク媒体などが挙げられる。

【0079】

以下の実施例にて、本発明をさらに詳細に説明するが、これらは本発明の例示の目的で提供されるものであり、なんら本発明を限定するものではない。

【0080】

【実施例】

以下の実施例で使用した試薬類は、言及した場合を除き、ナカライテスク、和光純薬、またはSIGMA (St Louis, MO, USA) から入手した。

【0081】

(実施例1) デカルバミラーゼのネイティブ結晶の調製

公知の方法 (H. Nanbaら、Biosci. Biotechnol. Biochem. 62、875-881 (1998) を参照のこと) により得られたデカルバミラーゼを10~20mg/mlの濃度に調製したデカルバミラーゼ溶液 (0.001M HEPES緩衝液、pH7.5) 10 μ lおよび沈澱剤として15~20重量%ポリエチレングリコール6000 (ナカライテスク社製)、0.2M塩化リチウムを含む0.1M HEPES緩衝液、pH7.5 (シグマ社製) 10 μ lを液滴台上で混合し、前記沈澱剤組成をもつ溶液300 μ lをリ

08~127, 143~148および164~177の範囲)内のアミノ酸について、代表的には、少なくとも60%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは90%、さらに好ましくは95%同一である。

【0075】

ある酵素についての特性を、類似する酵素の立体構造を用いて変換した例には、エキスパンダーゼ (Expandase) と称する酵素の基質特異性変換に類似構造を有するイソペニシリン合成酵素の立体構造を利用した研究がある。国際公開WO97/02005号パンフレットを参照のこと。この文献においては、立体構造がすでに決定されたイソペニシリン合成酵素 (Roach (1995)、Nature、375、700~704頁) と一次構造 (アミノ酸配列) に類似性があり、その立体構造が類似することが示唆されていたエキスパンダーゼの基質認識に関与するアミノ酸残基を両方の酵素の配列比較によって同定し、それらのアミノ酸残基の変異によってエキスパンダーゼの基質特異性を変換してペニシリンGに作用する変異酵素を作製することに成功している。

【0076】

アミノ酸配列の同一性の比較は、例えば、以下の配列分析用ツールを用いて算出し得る: FASTA (W. R. PearsonおよびD. J. Lipman、PNAS 85、2444-2448 (1988)); BLAST (S. F. Altschul、T. L. Madden、A. A. Schaffer、J. -H. Zhang、Z. Zhang、W. Miller、およびD. J. Lipman (1997) Nucl. Acids. Res. 25:3389-3402 (1997)); UnixベースのGCGWisconsinPackage (Program Manual for the Wisconsin Package、Version 8、1994年9月、Genetics Computer Group、575 Science Drive Madison、Wisconsin、USA 53711; Rice、P. (1996) Program Manual for EGCG Package、Peter Rice、The Sanger Centre、Hinxton Hall、Cambridge、CB101RQ、England) および the EXPASy World Wide Web 分子生物学用サー

に従って提供され得る。本明細書中において、農学組成物は、賦形剤、安定剤、キャリアなどの農学的に受容可能な任意の補助成分を含有し得る。

【0072】

本発明のデカルバミラーゼ変異体を利用して製造されたD- α -アミノ酸類を食品添加物の中間体（例えば、D-アラニンおよびD-アスパラギン酸）として、食品添加物（例えば、アリテーム）の製造に利用し得る。

【0073】

本発明のさらに他の実施態様において、デカルバミラーゼ変異体またはそれに類似する酵素のインヒビターが設計され、そして製造され得る。インヒビターは、デカルバミラーゼの構造情報を利用して設計され得る。当業者は、例えば、Segel, I. H., Enzyme Kinetics, J. Wiley & Sons, (1975) による標準式を用いるコンピューター適合酵素反応速度論データにより、インヒビターが競合的、不競合的、または非競合的であることを同定し得る。さらに、デカルバミラーゼまたはその類似酵素の反応中間体（例えば、基質または反応生成物との複合体の立体構造）の情報を用いて、インヒビターを設計することが可能である。このような情報は、公知のデカルバミラーゼまたはその類似酵素インヒビターとして公知の化合物の改良アナログの設計、および新規クラスのインヒビターの設計に有用である。

【0074】

本発明のさらに別の実施態様において、本発明のデカルバミラーゼの立体構造を利用して、デカルバミラーゼのアミノ酸配列に類似するポリペプチド酵素またはタンパク質酵素（例えば、アミダーゼまたはニトリラーゼ）を改変し得る。改変は、上記の変異体の設計と同様の指針に従って行われ得る。ここで、「類似する」ポリペプチド酵素またはタンパク質酵素は、好ましくは、そのアミノ酸配列が、配列番号1または2に示されるデカルバミラーゼのアミノ酸配列と、全長アミノ酸配列について、代表的には少なくとも30%、好ましくは、少なくとも50%、より好ましくは、少なくとも80%同一であり、特にデカルバミラーゼの活性部位を規定する領域（配列番号1または2のアミノ酸Glu46、Lys126、Glu145、およびCys171を含む、アミノ酸番号38~49、1

来の工程により、精製され得る。

【0067】

一旦、デカルバミラーゼへの変異が所望の位置（例えば、活性部位、安定性に関する部位、または結合部位など）で作製されると、得られた変異体は、目的のいくつかの特性のいずれかについて試験され得る。

【0068】

例えば、変異体は、生理学的 pH における荷電の変化についてスクリーニングされ得る。これは変異前のデカルバミラーゼの等電点 (pI) と比較したデカルバミラーゼ変異体の等電点を測定することにより決定される。等電点は、Weilner, D., Analyt. Chem., 43, 597頁 (1971) の方法によるゲル電気泳動により測定される。表面荷電が変化した変異体は、本発明の構造情報により提供されるように、酵素の表面に位置する置換アミノ酸によって変化した pI を有するデカルバミラーゼタンパク質である。

【0069】

さらに、変異体は、変異前のデカルバミラーゼと比較して高い比活性についてスクリーニングされ得る。変異体の活性は、例えば、本明細書中に記載のアッセイ（下記の実施例 7 を参照のこと）を用いて、D-N-カルバモイル- α -アミノ酸の D- α -アミノ酸類への変換能力を測定することにより決定される。

【0070】

本発明のデカルバミラーゼ変異体を利用して製造された D- α -アミノ酸類は、医薬中間体（例えば、D-フェニルグリシンおよび D-パラヒドロキシフェニルグリシン）として、医薬（例えば、合成ペニシリンおよび合成セファロスポリン）の製造に利用し得る。このように製造した医薬を含有する薬学的組成物もまた、本発明に従って提供され得る。薬学的組成物は、賦形剤、安定剤、キャリアなどを含む薬学的に受容可能な任意の補助成分を含有し得る。

【0071】

本発明のデカルバミラーゼ変異体を利用して製造された D- α -アミノ酸類を農薬中間体（例えば、D-バリン）として、農薬（例えば、フルバリネート）の製造に利用し得る。このように製造した農薬を含有する農薬組成物もまた本発明

これらのベクター中で使用される。このような有用な発現制御配列としては、例えば、ウイルスの遺伝子発現を制御することが公知である他の配列およびこれらの組み合わせが挙げられる。

【0063】

広範な種の宿主がまた、本発明によるデカルバミラーゼ変異体の産生に有用である。これらの宿主として、例えば、E. coli、Bacillus および Streptomyces のような細菌、酵母のような真菌、CHO細胞のような動物細胞、植物細胞およびトランスジェニック宿主細胞が挙げられる。

【0064】

すべての発現ベクターおよび発現系が、本発明の変異DNA配列を発現し、そしてデカルバミラーゼ変異体を産生するのに、同じ様式で機能するとは限らないことが理解されるべきである。全ての宿主が同一の発現系を用いて等しく良好に機能するわけではない。しかし、当業者は、過度な実験を行うことなくそして本発明の範囲を逸脱することなく、適切なベクター、発現制御配列および宿主を選択し得る。

【0065】

例えば、選択の際は、そのベクターの複製能力が考慮されねばならない。発現制御配列の選択の際、種々の要因がまた考慮されるべきである。これらは、例えば、系の相対的強度、その制御能力、本発明のデカルバミラーゼ変異体をコードするDNA配列との適合性、特に潜在的二次構造に関する適合性がまた考慮されるべきである。宿主は、選択されたベクターとの適合性、宿主に対するデカルバミラーゼ変異体の毒性、成熟産物を分泌する能力、タンパク質を適切に折り畳む能力および適切な高次構造を形成する能力、発酵要求性、宿主からのデカルバミラーゼ変異体の精製の容易さおよび安全性の考察により選択されるべきである。これらのパラメーター内で、当業者は有用な量の変異デカルバミラーゼを産生し得る、種々のベクター／発現制御系／宿主の組み合わせを選択し得る。

【0066】

これらの系または他の系で産生されるデカルバミラーゼ変異体は、デカルバミラーゼ活性を有する天然の酵素を精製するために使用される工程を含む種々の従

列を含む。変異は、デカルバミラーゼの完全長DNA配列、あるいはそのフラグメントポリペプチドをコードする任意の配列中に作製され得る。

【0060】

本発明に従って、上記方法または当該分野で公知の代替方法により產生される変異デカルバミラーゼDNA配列は、発現ベクターを用いて発現され得る。当該分野で周知であるように、発現ベクターは、典型的には宿主ゲノムから独立した宿主細胞中での自己複製を可能にするエレメント、および選択目的のための1つ以上の表現型マーカを含む。所望のデカルバミラーゼ変異体コード配列を囲むDNA配列の挿入の前または後に、発現ベクターはまた、プロモーター、オペレーター、リボソーム結合部位、翻訳開始シグナル、および必要に応じてリプレッサー遺伝子または種々のアクチベーター遺伝子ならびに終止シグナルをコードする制御配列を含む。いくつかの実施態様において、產生された変異体の分泌が所望される場合、「シグナル配列」をコードするヌクレオチドがデカルバミラーゼ変異体コード配列の前に挿入され得る。制御配列の制御下での発現のためには、所望のDNA配列は、制御配列に作動可能に連結されなければならない。すなわち、制御配列の制御下にあるデカルバミラーゼ変異体をコードする配列は、この配列の発現産物の產生を可能にするために、適切なリーディングフレームを維持するように開始シグナル（すなわちATG）を有さなければならない。

【0061】

広範な周知の利用可能な発現ベクターは、いずれも本発明の変異されたデカルバミラーゼコード配列を発現するのに有用である。これらは、公知の細菌プラスミド（例えば、pBR322）、より広い宿主域のプラスミド（例えば、RP4、ファージDNA）、2 μ プラスミドまたはそれらの誘導体のような酵母プラスミドならびにプラスミドおよびファージDNAの組合わせから得られるベクターのような、染色体DNA配列、非染色体DNA配列および合成DNA配列のセグメントからなるベクターを包含する。

【0062】

さらに、DNA配列に作動可能に連結した場合、その発現を制御する、任意の広範な発現制御配列が、本発明による変異されたDNA配列を発現するためにこ

応 pH の最適化、熱および空気酸化に対する安定性向上等を目指した分子設計を行うことにより、工業利用により有利な優れたデカルバミラーゼ変異体を提供すること、および得られたデカルバミラーゼ変異体を利用した D- α -アミノ酸の製造方法を提供することを目的とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、デカルバミラーゼの単結晶およびその重原子誘導体結晶を取得し、これら結晶の重原子同型置換法および多波長異常分散法を用いた X 線結晶構造解析によりデカルバミラーゼの精密な立体構造を決定し、そしてこれらの立体構造を基に特性の改善された変異体を作製することにより、本発明を完成するに至った。

【0011】

本発明は、直方晶系の空間群 $P2_12_12$ および配列番号 1 に示されるアミノ酸配列、または直方晶系の空間群 $P2_12_12$ および配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を有する、デカルバミラーゼ結晶に関する。結晶が直方晶系の空間群 $P2_12_12$ および配列番号 1 に示されるアミノ酸配列、または空間群 $P2_12_12$ および配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を有する、デカルバミラーゼ結晶に関する。一つの実施態様において、上記結晶は直方体形状の単位格子を有し、単位格子定数： $a = 66.5 \sim 68.5 \text{ \AA}$ 、 $b = 135.5 \sim 138.0 \text{ \AA}$ 、 $c = 66.5 \sim 68.5 \text{ \AA}$ を有し得る。また、上記アミノ酸配列が配列番号 1 であり得る。別の実施態様において、上記結晶は直方体形状の単位格子を有し得、そして単位格子定数： $a = 68.5 \sim 70.5 \text{ \AA}$ 、 $b = 138.0 \sim 140.5 \text{ \AA}$ 、 $c = 68.5 \sim 73.0 \text{ \AA}$ を有し得る。他の実施態様において、上記結晶は直方体形状の単位格子を有し得、そして、単位格子定数： $a = 81.5 \sim 82.5 \text{ \AA}$ 、 $b = 133.0 \sim 135.0 \text{ \AA}$ 、 $c = 119.5 \sim 121.5 \text{ \AA}$ を有し得る。また、上記アミノ酸配列は配列番号 2 であり得る。1 つの局面において、本発明は結晶中のデカルバミラーゼ 1 分子当たり少なくとも 1 つ以上の重金属原子を含む結晶を提供し得る。一つの実施態様において、上記重金属原子は水銀、金、白金、鉛、イリジウム、オスミウムおよびウランのうちいずれかであり得る。他の実施

態様において、本発明はデカルバミラーゼ結晶を液体窒素下で凍結させることにより調製される凍結結晶を提供し得る。

【0012】

別の局面において、本発明は、デカルバミラーゼ結晶の製造方法であって、1～50 mg/ml の濃度でデカルバミラーゼの溶液を与える工程、5～30 重量%の濃度でポリエチレングリコール（PEG）あるいはメトキシポリエチレングリコール（PEGMME）を含有し、かつ6.0～9.0のpHを与える濃度の緩衝剤を含有する沈澱剤溶液を与える工程、該デカルバミラーゼ溶液を該沈澱剤溶液と混合する工程、および得られる混合溶液を、該溶液中のデカルバミラーゼ結晶が既定の大きさ以上に成長するまで既定の期間放置する工程を包含する、方法を提供する。1つの実施態様において、本発明の方法はまた、混合する工程が、デカルバミラーゼ溶液の液滴を前記沈澱剤溶液の液滴と混合させることを包含し、そして放置する工程が、混合工程で得られる混合液滴を密閉容器中で沈澱剤溶液を保持する溶液溜め部上に懸垂させることを包含し、ここで、該溶液溜め部中の該沈澱剤溶液の蒸気圧は該混合液滴の蒸気圧より低い。本発明の方法はまた、混合する工程が、前記デカルバミラーゼ溶液の液滴を上記沈澱剤溶液の液滴と混合させることを包含し、そして上記放置する工程が、混合工程で得られる混合液滴を密閉容器中で沈澱剤溶液を保持する溶液溜め部の液滴台に静置させることを包含し、ここで、該溶液溜め部中の該沈澱剤溶液の蒸気圧は該混合液滴の蒸気圧より低い。別の実施態様において、本発明の方法における混合溶液を放置する期間は1日から3週間である。他の実施態様において、本発明の方法は、上記デカルバミラーゼの溶液を与える工程の後に、該デカルバミラーゼ溶液をサイズ排除半透膜内に配置させる工程をさらに包含し、そして前記混合する工程が、該半透膜を通して沈澱剤溶液を該デカルバミラーゼ溶液中に拡散させることをさらに包含する。他の実施態様において、本発明の方法における上記混合する工程が、上記沈澱剤溶液を前記デカルバミラーゼ溶液に徐々に添加することを包含し、そして上記放置する工程が、得られる混合溶液を密閉容器内で放置することを包含する。別の局面において、本発明は、図1に示すタンパク質立体構造トポロジーを有する立体構造により特徴付けられるデカルバミラーゼに関する。一つの実

施態様において、本発明は、4本の α ヘリックスおよび12本の β ストランドの二次構造を含む4層サンドイッチ構造を有する、デカルバミラーゼに関する。本発明の好ましい実施態様において、酵素反応に関与するアミノ酸残基は、システイン1残基、グルタミン酸2残基、およびリジン1残基であり、酵素反応の基質がD-N-カルバモイル- α -アミノ酸であって、図3に示す基質結合様式を有する活性部位の立体構造により特徴付けられる。本発明の別の実施態様において、本発明は、デカルバミラーゼ活性を有する酵素分子であって、少なくとも、配列番号1または2における以下のアミノ酸：46位のGlu、126位のLys、145位のGlu、および171位のCysに対応するアミノ酸から形成される活性部位腔を有する、酵素分子に関する。別の実施態様において、活性部位腔において、基質であるD-N-カルバモイル- α -アミノ酸は、反応時に前記配列番号1または2の126位のLys、143位のHis、145位のGlu、174位のArg、175位のArg、および197位のThrに対応するアミノ酸と相互作用する。他の実施態様では、上記活性部位腔において、前記配列番号1または2の46位のGlu、145位のGluおよび171位のCysに対応するアミノ酸は水分子を介して水素結合している。なお別の実施態様において、上記D-N-カルバモイル- α -アミノ酸は、D-N-カルバモイル-フェニルグリシン、D-N-カルバモイル-パラヒドロキシフェニルグリシン、D-N-カルバモイル-フェニルアラニン、D-N-カルバモイル-バリン、D-N-カルバモイル-アラニン、D-N-カルバモイル-システイン、D-N-カルバモイル-アスパラギン酸、D-N-カルバモイル-グルタミン酸、D-N-カルバモイル-グリシン、D-N-カルバモイル-ヒスチジン、D-N-カルバモイル-イソロイシン、D-N-カルバモイル-リジン、D-N-カルバモイル-ロイシン、D-N-カルバモイル-メチオニン、D-N-カルバモイル-アスパラギン、D-N-カルバモイル-プロリン、D-N-カルバモイル-グルタミン、D-N-カルバモイル-アルギニン、D-N-カルバモイル-セリン、D-N-カルバモイル-スレオニン、D-N-カルバモイル-トリプトファン、D-N-カルバモイル-チロシンからなる群から選択される。さらに別の実施態様において、本発明は、本発明のデカルバミラーゼの立体構造から分子設計手法により構

築された、デカルバミラーゼあるいはその変異体とD-N-カルバモイル- α -アミノ酸あるいはD- α -アミノ酸との複合体立体構造により特徴付けられるデカルバミラーゼ複合体に関する。

【0013】

本発明の一つの局面において、本発明は、デカルバミラーゼ変異体を設計する方法であって、デカルバミラーゼの請求項14、16、または21のいずれか1項に記載の立体構造に基づいて物性および／または機能を改変したデカルバミラーゼ変異体を設計する工程、を包含する、方法に関する。別の局面において、本発明は、デカルバミラーゼ変異体を設計する方法であって、デカルバミラーゼ活性を有する酵素の結晶を生成する工程、該結晶のX線結晶構造解析により立体構造を決定する工程、および決定した該結晶の立体構造に基づいて物性および／または機能の向上したデカルバミラーゼ変異体を設計する工程を包含する方法に関する。さらに別の局面において、本発明は、デカルバミラーゼ変異体を製造する方法であって、該方法が、デカルバミラーゼ活性を有する酵素の結晶を生成する工程、該結晶のX線結晶構造解析により該結晶の立体構造を決定する工程、決定した該結晶の立体構造に基づいて物性および／または機能の向上したデカルバミラーゼ変異体を設計する工程、および該デカルバミラーゼ変異体を産生する工程を包含する、方法に関する。一つの実施態様において、本発明の方法で使用される上記立体構造は、本発明のデカルバミラーゼの立体構造である。別の実施態様において、上記デカルバミラーゼ変異体を設計する工程は、酵素の基質特異性の変更、酵素比活性の変更、酵素の安定性向上、至適pHの最適化および酵素の水溶性の変更からなる群から選択される1以上の酵素特性の改変を目的とする。さらに別の実施態様において、上記デカルバミラーゼ変異体の製造方法は、酵素の安定性向上を目的とする。好ましくは、酵素の安定性向上に関する変異体の設計は空気酸化による活性低下を招くアミノ酸残基を置換する変異を含む。他の実施態様において、上記酵素特性の改変は、酵素比活性の変更および至適pHの最適化を含む。

【0014】

別の局面において、本発明は、本発明の方法によって得られたデカルバミラー

ゼ変異体に関する。本発明はまた、本発明の立体構造を利用してデカルバミラーゼのインヒビターをスクリーニングおよび／または設計する方法を提供する。さらに別の局面において、本発明は、デカルバミラーゼ結晶の立体構造またはデカルバミラーゼの立体構造を利用して、アミノ酸一次配列がデカルバミラーゼと少なくとも30%の類似性を有する別のポリペプチド酵素またはタンパク質酵素を改変方法を提供する。

【0015】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0016】

本明細書において、「デカルバミラーゼ活性」とは、D-N-カルバモイル- α -アミノ酸を、そのアミノ酸を修飾しているカルバモイル基を除去してD- α -アミノ酸に変換する活性をいう。「デカルバミラーゼ」とは、デカルバミラーゼ活性を有する酵素をいう。デカルバミラーゼの例としては、配列番号1または配列番号2のアミノ酸配列を有する酵素が挙げられる。配列番号1のアミノ酸配列を有するデカルバミラーゼは、*Agrobacterium* sp. KNK 712から単離され配列決定された。配列番号2のアミノ酸配列を有する酵素は、配列番号1からランダム変異によるスクリーニングにより、*E. coli* 変異株から得た酵素である。

【0017】

本明細書において、デカルバミラーゼまたは他の酵素の変異体の「変異体」とは、もとの酵素のアミノ酸配列のアミノ酸が少なくとも1つ以上置換、付加、もしくは欠失、または修飾されたアミノ酸配列を有し、もとの酵素の活性の少なくとも一部を保持する改変された酵素をいう。「活性断片」とは、あるタンパク質酵素またはポリペプチド酵素のアミノ酸配列の一部を有する断片であって、もとの酵素の活性の少なくとも一部を保持する断片をいう。ここで、「活性の少なくとも一部」とは、代表的には、もとの酵素の少なくとも10%の比活性、好ましくは元の酵素の少なくとも50%の比活性をいうが、所望によって、10%未満の比活性をいう場合もある。

【0 0 1 8】

本明細書において、「ネイティブ結晶」とは、デカルバミラーゼを硫酸、ポリエチレングリコールなどの沈澱剤および添加塩類等を適切な組成で含有する緩衝液中で、単結晶にまで成長させたものであって、重金属原子を含有しない結晶をいう。

【0 0 1 9】

本明細書において、「重原子誘導体結晶」とは、以下のいずれかの結晶をいう：
 (i) 調製したネイティブ結晶を水銀、金、白金、鉛、イリジウム、オスミウムおよびウランなどの重金属化合物を含んだ溶液に浸漬することで、結晶性を崩すことなく、結晶中のデカルバミラーゼに重金属原子を共有結合あるいは配位結合等により結合させた結晶、
 (ii) 硫酸、ポリエチレングリコールなどの沈澱剤および添加塩類等を適切な組成で含有する緩衝液であって、さらに適切な濃度で上記重金属化合物を含有する溶液中で、デカルバミラーゼを単結晶にまで成長させた結晶、および
 (iii) デカルバミラーゼのメチオニンおよび／またはシステイン残基がセレノメチオニンおよび／またはセレノシステインに置換した変異体を用いて得られる結晶。

【0 0 2 0】

本発明の一つの実施態様において、配列番号 1 または 2 のアミノ酸配列を有するデカルバミラーゼの結晶は、用いる溶液の濃度および pH を規定の範囲内（デカルバミラーゼの濃度については、1 ～ 5 0 m g / m l、ポリエチレングリコールまたはメトキシポリエチレングリコールの濃度については 5 ～ 3 0 重量%、pH については 6. 0 ～ 9. 0）に細心に調節しながら、ポリエチレングリコール（PEG）またはメトキシポリエチレングリコール（PEGMME）、緩衝剤および任意の添加塩類を含有する沈澱剤溶液から成長させ得る。タンパク質の結晶成長に一般的に用いられる三種類の基本技術のいずれか、すなわち蒸気拡散法、透析法およびバッチ法（Methods in Enzymology、第 1 1 4 巻、Diffraction Methods for Biological Macromolecules Part A または第 2 7 6 巻 Macromolecular Crystallography Part A）のいずれかを

用い得るが、蒸気拡散法が好ましい。

【0021】

蒸気拡散法は、沈澱剤を含むタンパク質溶液の液滴を、より高濃度の沈澱剤を含む緩衝液（外液）の入った容器中に置き、密封後静置しておく方法である。液滴の置き方によって、懸滴（hanging-drop）法およびシッティングドロップ（sitting drop）法がある。懸滴（ハンギングドロップ）法は、タンパク質溶液の小さな液滴をカバーガラス上に配置し、カバーガラスを溶液溜め（リザーバー）上で反転させ、密封する。他方、シッティングドロップ法では、リザーバー内部に適切な液滴台を設置し、タンパク質溶液の小滴を液滴台上に配置し、カバーガラス等でリザーバーを密封する。リザーバー中の溶液は沈澱剤を含有し、沈澱剤はタンパク質小滴中にも少量存在する。蒸気拡散法で使用する沈澱剤溶液は、以下の成分を含有するように形成させる：（a）分子量4000～9000、好ましくは平均分子量7500と10～20重量%の濃度とを有するPEGまたはPEGMME、（b）添加塩として0.1～0.5Mの濃度を有する食塩、塩化リチウム、塩化マグネシウム（最良の結果は0.2M塩化リチウムによって得られる）、および（c）pH6.5～8.0、好ましくはpH7.5を与えるに十分な量の緩衝剤。0.05～0.1MのHEPES（Sigma、St Louis, MO, USA）がこの目的に使用できる。リン酸ナトリウム、リン酸カリウムおよびトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンマレート等の他の緩衝剤もまた用い得る。

【0022】

「バッチ法」とは、タンパク質溶液に沈澱剤溶液を少しずつ加え、わずかに濁ったところ不溶物を遠心分離して除去後、上清を小さな試験管に入れて密封した後、静置しておく方法をいう。また、「透析法」とは、タンパク質溶液を沈澱剤の入った緩衝液（外液）に対して、半透膜を用いて透析する方法をいう（Methods in Enzymology、第114巻、Diffraction Methods for Biological Macromolecules Part A）。

【0023】

本明細書において、「既定の大きさ」とは、X線結晶構造解析で測定可能な最低限の大きさをいい、本発明のデカルバミラーゼの場合、好ましくは $0.3 \times 0.3 \times 0.1$ mmであり得る。また、「既定の期間」とは、結晶の大きさが既定の大きさ以上に達するのに十分な期間をいい、本発明のデカルバミラーゼの場合、好ましくは1日～3週間であり得る。

【0024】

上記のように調製したX線結晶構造解析に適した既定の大きさを有する配列番号1のデカルバミラーゼのネイティブ結晶は、(1)菱形板状の外形を有し、そして(2)同一外形を有する結晶であっても、異なる単位格子定数を有し得る。また、X線結晶構造解析には適さないが、沈澱剤、緩衝液等の条件を適切に選択することによって、針状あるいは柱状の外形を有する小型あるいは微小結晶が得られる。このような結晶の用途に関して酵素の微小結晶をグルタルアルデヒド等のタンパク質架橋試薬によって架橋することによって、有機溶媒を含む状態においても酵素反応を長期間安定に行うことを可能とするCLEC (Cross-Linked Enzyme Crystal) と呼ばれる技術が報告されている (N. L. St. Clair & M. A. Navia, (1992) J. Am. Chem. Soc. 114, 7314-7316)。本発明によって得られるデカルバミラーゼの結晶は、CLEC技術の適用範囲を拡大するものである。

【0025】

本発明の1つの実施態様において、X線結晶構造解析に有効な重原子誘導体結晶、すなわちネイティブ結晶の結晶性を保持しつつ、結晶中のタンパク質に重金属原子が結合した結晶が提供される。重原子誘導体結晶は、タンパク質のX線結晶構造解析の基本技術である重原子同型置換法および多波長異常分散法を適用する際に利用される。デカルバミラーゼの重原子誘導体結晶は、ネイティブ結晶が溶解、崩壊せず少なくとも数日以上安定に保存され得る、所要の濃度を与える重金属化合物を含有させた溶液に結晶を浸漬する浸漬法により調製し得る。浸漬法に使用される重金属化合物は、金、白金、イリジウム、オスミウム、水銀、鉛、ウラン、サマリウムなどを含む金属塩あるいは有機金属化合物である。重金属浸漬法では、 $0.1 \sim 100$ mM濃度の重金属化合物、例えば水銀化合物であるE

MTS (エチル水銀チオサリチル酸ナトリウム塩)、カリウムジシアノ金 (I) などを含有し、所望の pH を与える適切な沈澱剤および添加塩組成を有する保存溶液が使用し得る。保存溶液の好ましい例は、20~30 重量% ポリエチレングリコール 6000 および 0.2M 塩化リチウムを含む 0.01M HEPES 緩衝液 (pH 7.5) である。重金属原子が結晶中に導入、すなわち結晶中のタンパク質に結合しているかどうかの判定は、浸漬法により調製した結晶の X 線回折強度データを収集し、あらかじめ取得しているネイティブ結晶の回折強度データと比較することによって行い得る。

【0026】

あるいは、デカルバミラーゼを生産する微生物 (例えば、アグロバクテリウム属の DNA を有する組換え *E. coli* など) を重金属原子であるセレンを含有したセレノメチオニンあるいはセレノシステインを含む培地で生育、培養することにより、デカルバミラーゼ中のメチオニンあるいはシステイン残基がセレノメチオニンあるいはセレノシステインに置換した変異体が取得され得る。このように浸漬法を用いることなく重金属原子をタンパク質中に導入したデカルバミラーゼが取得されれば、上記条件等を用いた結晶化により重原子誘導体結晶を調製し得る。

【0027】

一般に、タンパク質の結晶は、X 線によりかなり損傷を受けることが知られているので、X 線結晶構造解析を成功させるためには、損傷を受け難い結晶を取得することが重要である。近年では、結晶を凍結させ、凍結状態のままで回折データを測定することで高品質、高分解能の回折データを取得する試みが行われている (Methods in ENZYMOLOGY 第 276 巻、Macromolecular Crystallography, Part A、C. W. Carter, Jr. および R. M. Sweet 編、[13] Practical Cryocrystallography (D. W. Rodgers))。一般に、タンパク質結晶の凍結には、凍結による結晶の崩壊を防ぐ目的で、グリセロールなどの凍結安定化剤を含む溶液で処理するなどの工夫がなされる。本発明においては、デカルバミラーゼのネイティブ結晶および重原子誘導体の凍結結晶は

、凍結安定化剤を添加することなく、結晶化小滴あるいは浸漬溶液中の結晶を取り出し、液体窒素に直接浸漬して瞬時に凍結させることで調製し得る。凍結結晶はまた、凍結安定化剤を添加した保存液に浸漬した結晶に対して上記瞬時に凍結させる操作を行うことによっても調製し得る。

【0028】

類縁タンパク質の立体構造が未知であり、その立体構造を利用した分子置換法による構造解析が不可能なデカルバミラーゼなどの新規タンパク質の立体構造決定においては、重原子同型置換法 (Methods in ENZYMOLOGY 第115巻、Diffraction Methods for Biological Macromolecules, Part B, H. W. Wyckoff, C. H. W. Hirs, およびS. N. Timasheff編、ならびにMethods in ENZYMOLOGY 第276巻、Macromolecular Crystallography, Part A, C. W. Carter, Jr. およびR. M. Sweet編) または多波長異常分散法 (S. N. Timasheff編、ならびにMethods in ENZYMOLOGY 第276巻、Macromolecular Crystallography, Part A, C. W. Carter, Jr. およびR. M. Sweet編) が適用され得る。すなわち、ネイティブ結晶および重原子誘導体結晶の回折データ間の回折強度差、あるいは異なる波長で測定した回折データ間の回折強度差から、電子密度を計算するための初期位相を求めることにより立体構造を決定し得る。重原子同型置換法または多波長異常分散法を適用するデカルバミラーゼの立体構造決定においては、重金属原子として例えば水銀、金、白金、ウラン、セレン原子などを含有した重原子誘導体結晶を用い得る。好ましくは、水銀化合物EMTSまたはカリウムジシアノ金 (I) を利用した浸漬法により得られる重原子誘導体結晶が用いられる。

【0029】

ネイティブ結晶および重原子誘導体結晶の回折データは、R-Axis IIc (理学電機) あるいはSpring-8 (西播磨大型放射光施設) のタンパク質結晶構造解析用ビームラインを用いて測定し得る。多波長異常分散法を適用す

るための複数波長での回折データ測定は、SPring-8のタンパク質結晶構造解析用ビームラインを用いて実施し得る。測定した回折画像データは、RAXIS IIC付属のデータ処理プログラムまたはプログラムDENZO（マクサイエンス）または同様な画像処理プログラム（または単結晶解析用ソフトウェア）を用いて、反射強度データに処理される。ネイティブ結晶の反射強度データ、複数波長での重原子誘導体結晶の反射強度データ波長の測定により得られた反射強度データから、差パターン図を利用して結晶中のタンパク質に結合した重金属原子の位置を求めた後、プログラムPHASES（W. Furey、University of PennsylvaniaあるいはCCP4（British Biotechnology & Biological Science Research Council、SERC）または同様の回折データ解析プログラムを用いて重原子位置パラメータを精密化することにより初期位相が決定される。決定された初期位相は、プログラムDM（CCP4パッケージ）または同様な位相改良プログラム（電子密度改良プログラム）を用いた溶媒平滑化法およびヒストグラムマッチング法に従って、デカルバミラーゼ結晶中の溶媒領域を30～50%、好ましくは35%として、低分解能から高分解能まで徐々に位相拡張計算を行うことにより信頼性の高い位相へと改良される。タンパク質の結晶は、その体積の30～60%がタンパク質以外の溶媒分子（主として水分子）で占有されている。本明細書において、溶液中の溶媒分子の占める体積を「溶媒領域」とする。一般に、得られたタンパク質結晶が非結晶学的な対称を有する場合には、非結晶学的対称（NCS）平均化と呼ばれる電子密度の平均化を行うことにより、さらに位相の信頼性を高めることが可能である。デカルバミラーゼの結晶は、結晶の密度測定の結果から非対称単位中に2分子が含まれることがわかっており、結晶中のデカルバミラーゼ分子は非結晶学的な2回軸を持つことが推定される。溶媒平滑化法を適用した後の位相を用いて計算した電子密度図および精密化した重原子座標から、並進および回転を含む非結晶学的対称マトリックスが算出される。同時に溶媒平滑化法で得られた電子密度図から、マスクと呼ばれるタンパク質の分子が存在する領域を同定し得る。非結晶学的対称マトリックスおよびマスクを用いて、プログラムDMなどによりNCS平均化計算を行

うことにより、信頼性の高い位相に改良され、立体構造モデルの構築に用いる電子密度図が得られる。

【0030】

デカルバミラーゼの立体構造モデルは、プログラムオー（プログラムO）（A. Jones, Uppsala Universitet, スウェーデン）により3次元グラフィックス上に表示した電子密度図から、以下の手順で構築し得る。まず、特徴的なアミノ酸配列を有する複数の領域（トリプトファン残基を含む部分配列など）を電子密度図上で探し出す。次に、見出した領域を起点にしてアミノ酸配列を参照しながら、電子密度に適合するアミノ酸残基の部分構造をプログラムOを用いて3次元グラフィックス上で構築する。、順次この作業を繰り返すことにより、デカルバミラーゼのすべてのアミノ酸残基を相当する電子密度に適合させ、分子全体の初期立体構造モデルを構築する。構築された立体構造モデルは、それを出発モデル構造として、構造精密化プログラムであるXPLO（A. T. Brunger, Yale University）の精密化プロトコルに従って、立体構造を記述する三次元座標が精密化される。また、デカルバミラーゼ（例えば、配列番号1に示されるデカルバミラーゼ）のネイティブ結晶の立体構造およびデカルバミラーゼ変異体（例えば、配列番号2に示される配列を有するデカルバミラーゼ変異体）ネイティブ結晶の立体構造は、得られたEMTS誘導体結晶の立体構造を用いた分子置換法により初期位相を求め、前記の電子密度改良、モデル構築、構造精密化手順に従うことにより各々の立体構造を決定し得る。このことにより、本発明のデカルバミラーゼの立体構造の決定が完成される。決定したデカルバミラーゼの立体構造について、タンパク質立体構造の公的データバンクであるプロテインデータバンク（PDB）に登録されている種々のタンパク質（デカルバミラーゼと機能において類似する酵素を含む）の立体構造との比較を行い得る。デカルバミラーゼと同様の脱カルバミル化反応を触媒するN-カルバミル-ザルコシン-アミドヒドラーゼの立体構造が知られているが（プロテインデータバンクID、1NBA）、デカルバミラーゼの立体構造は、この酵素の立体構造との構造類似性は認められない。プロテインデータバンクに立体構造が登録されているタンパク質の中では、ペニシリンアシラーゼ（1P

NK)、グルコサミン-6-ホスフェイト合成酵素(1GDO)、グルタミンホスフォリボシルピロホスフェイト アミドトランスフェラーゼ(1ECF)、およびプロテオソーム(1PMA)などがその立体構造に含まれるドメインと呼ばれる部分構造において、2層に積層した β シートの両側に α ヘリックス構造が密着した4層サンドイッチと呼ばれる構造を有しており、デカルバミラーゼの立体構造との類似性が認められる。しかし、これらドメイン構造とデカルバミラーゼの立体構造とは、 α ヘリックスおよび β ストランドの幾何学的な並び、いわゆるタンパク質立体構造トポロジー(T. P. Floresら、(1994)、Prot. Eng. 7、31-37)が異なっている。すなわち、デカルバミラーゼの立体構造は、 β シート構造内において平行 β ストランドを有することを特徴とするものであり(図1)、4層サンドイッチ構造を有するタンパク質としても、デカルバミラーゼは新規の立体構造である。このように、「トポロジー」とは、本明細書中において、タンパク質の二次構造単位の並びまたは空間配置のことをいう。

【0031】

本明細書において、「 α ヘリックス」とは、タンパク質またはポリペプチドの二次構造の一つであり、アミノ酸が3.6残基ごとに1回転したピッチが5.4の螺旋構造を有するエネルギー的に最も安定な構造の1つをいう。 α ヘリックスを形成しやすいアミノ酸としては、グルタミン酸、リジン、アラニン、およびロイシンなどが挙げられる。逆に、 α ヘリックスを形成しにくいアミノ酸としては、バリン、イソロイシン、プロリン、およびグリシンなどが挙げられる。また、本明細書において、「 β シート」とは、タンパク質またはポリペプチドの二次構造の一つであり、ジグザグに伸びたコンホメーションを有する二本以上のポリペプチド鎖が平行に並び、ペプチドのアミド基およびカルボニル基が、それぞれ隣接するペプチド鎖のカルボニル基およびアミド基との間に水素結合を形成することによりエネルギー的に安定なシート状により合わさった構造をいう。なお、「平行 β シート」とは、 β シートのうち、隣接するポリペプチド鎖のアミノ酸配列の並び方が同じ方向のものをいい、「逆平行 β シート」とは、 β シートのうち、隣接するポリペプチド鎖のアミノ酸の並び方が逆方向のものをいう。さらに、本

明細書において、「 β ストランド」とは、 β シートを形成するジグザグに伸びたコンフォメーションを有する 1 本のペプチド鎖をいう。

【0032】

デカルバミラーゼのカルボキシ末端約 30 残基の領域（配列番号 1 または 2 のアミノ酸 280 位付近～カルボキシ末端 303 位）は、分子間相互作用により二量体形成に関与していることが明らかとなった。また、本研究に供したデカルバミラーゼ結晶中では、二量体がさらに分子間相互作用により四量体を形成していることが明らかとなった。デカルバミラーゼの 4 層サンドイッチ構造は、4 本の α ヘリックスおよび 12 本の β ストランドの 2 次構造単位よりなる。表 1 においては、すべての 2 次構造単位を示した。

【0033】

【表 1】

デカルバミラーゼの 2 次構造単位

α ヘリックス	β ストランド
Arg20 -Arg36	Gln3 -Gln10
Glu61 -Asp65	Phe41 -Val43
Arg78 -Leu87	Gly90 -Val199
Glu145-Tyr148	Arg106-Val114
Pro177-Leu185	Ile120-Arg125
Thr211-Asn226	Val158-Val161
Arg279-Arg282	Ala164-Met168
	Ile190-Tyr195
	Trp229-Gly234
	Gly237-Glu239
	Cys242-Leu244
	Cys249-Val251
	Ile257-Leu260
	Glu267-Asp274

【0034】

以下、本発明のデカルバミラーゼの立体構造の特徴についてまとめた。

【0035】

(1) 6 本の β ストランドからなる β シートが 2 層に積層し、その両側に各 2 本の α ヘリックスが密着した 4 層サンドイッチと呼ばれる構造を有する（図 1 および図 2）。図 1 において、アミノ末端から数えて 1, 3, 5、および 6 番目の α

ヘリックス4本（それぞれ、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 5$ 、および $\alpha 6$ と称する）が密着している。

【0036】

(2) β シートは、6本の平行 β ストランドから主として形成され、立体構造既知のタンパク質には見られない配向を有する（図1）。

【0037】

(3) 酵素反応を触媒するアミノ酸残基としてシステイン1残基、グルタミン酸2残基、リジン1残基、ヒスチジン1残基およびアルギニン2残基を含む、立体構造既知の酵素にない基質結合様式を有する（図3）活性部位を形成している（図4）。

【0038】

(4) カルボキシ末端約30残基の領域が、分子間相互作用により二量体構造を形成している。

【0039】

なお、上記立体構造の具体的な座標データに関しては、プロテインデータバンク（PDB、Protein Data Bank、The Research Collaboratory For Structural Bioinformatics（RCSB）が運営）にCompound:N-Carbamyl-D-Amino Acid Amidohydrolase、Exp. Method:X-ray Diffractionとして登録予定であり、本明細書中でこのデータを援用する。

【0040】

本発明のデカルバミラーゼの立体構造決定が完成することによって、酵素の触媒活性に関与する残基を推定し得、さらに酵素単独の立体構造だけでなく、酵素に基質（例えば、D-N-カルバモイル-ヒドロキシフェニルグリシン）を結合させた複合体の立体構造モデルを分子モデリングの手法（Swiss-PDBViewer（前出）、Autodock（Oxford Molecular）、Guex、N. およびPeitsch, M. C.（1997）SWISS-MODEL and the Swiss-PDBViewer: An env

ironment for comparative protein modeling, Electrophoresis 18, 2714-2723; Morris, G. M. ら, J. Computational Chemistry, 19:1639-1662, 1998; Morris, G. M. ら, J. Computer-Aided Molecular Design, 10, 294-304, 1996; Goodsell, D. S. ら, J. Mol. Recognition, 9:1-5, 1996) により容易に構築し得る。本立体構造および立体構造モデルから、活性部位に存在し、触媒反応群のアミノ酸残基に関する構造および活性部位における反応機構に関する知見を入手し得る。デカルバミラーゼの活性部位は、Glu46、Lys126、His143、Glu145、Cys171、Arg174およびArg175のアミノ酸残基を含む腔（窪み）から形成されている（図4）。アミダーゼ、ニトリラーゼなど、デカルバミラーゼと弱い配列類似性を有する酵素とのアミノ酸配列比較により見出される保存されたアミノ酸残基の解析から、Glu46、Lys126、Glu145、Cys171が触媒反応に強く関与していることが示唆される。特にCys171は、酵素反応の中間体であるアシル中間体を形成するのに必須な触媒残基と推定され（図3）、デカルバミラーゼがシステインヒドラーゼであることを示している。本知見は、Cys171のSer171への変異で触媒活性が失われる実験事実にも一致している（R. Grifantini ら, (1996)、J. Biol. Chem. 271, 9326-9331）。Arg174およびArg175の役割は、基質であるD-N- α -カルバミルアミノ酸のカルボキシル基を静電相互作用によって、安定化することに寄与していると考えられる。

【0041】

これら立体構造より得られた知見に基づいて、デカルバミラーゼの安定性向上または酵素活性の向上を目的とした改変設計を行い得る。本明細書において、酵素の「安定性」とは、通常の生体環境よりも高い温度（例えば70℃）で酵素を変性させた後でも、酵素活性が熱変性前と比較して、少なくとも10%、好ましくは少なくとも25%、より好ましくは少なくとも50%、さらに好ましくは少なくとも80%、最も好ましくは少なくとも90%残存していることをいう。安

定性の向上は、例えば、 ΔT_m （変性温度の差分）で測定し得る。本明細書において「酵素活性」とは、デカルバミラーゼについて言及する場合、D-N-カルバモイル- α -アミノ酸を対応するD- α -アミノ酸に変換する活性をいう。

【0042】

本明細書において、変異体分子の「設計方法」または「分子設計手法」とは、変異前のタンパク質またはポリペプチド分子（例えば、天然型分子）のアミノ酸配列および立体構造を解析することによって、各アミノ酸がどのような特性（例えば、触媒活性、他の分子との相互作用など）を担うかを予測し、所望の特性の改変（例えば、触媒活性の向上、タンパク質の安定性の向上など）をもたらすために適切なアミノ酸変異を算出することをいう。この設計方法は、好ましくはコンピュータを用いて行われる。このような設計方法で用いられるコンピュータプログラムの例としては、本明細書において言及されるように、以下が挙げられる：構造を解析するプログラムとして、X線回折データの処理プログラムであるDENZO（マックスサイエンス）；位相を決定するための処理プログラムとして、PHASES（Univ. of Pennsylvania, PA, USA）；初期位相の改良のためのプログラムとして、プログラムDM（CCP4パッケージ、SERC）；3次元グラフィックスを得るためのプログラムとしてプログラムO（Uppsala Universitet, Uppsala, スウェーデン）；立体構造精密化プログラムとして、XPLOR（Yale University, CT, USA）；そして、変異導入モデリングのためのプログラムとして、Swiss-PDBViewer（前出）。

【0043】

本明細書中において、変異体の設計に利用されるアミノ酸変異としては、アミノ酸の置換のほかに、アミノ酸の付加、欠失、または修飾もまた挙げられる。アミノ酸の置換とは、もとのペプチドを1つ以上、例えば、1～20個、好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個のアミノ酸で置換することをいう。アミノ酸の付加とは、もとのペプチド鎖に1つ以上、例えば、1～20個、好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個のアミノ酸を付加することをいう。アミノ酸の欠失とは、もとのペプチドから1つ以上、例えば、1～20個、好ましく

は1～10個、より好ましくは1～5個のアミノ酸を欠失させることをいう。アミノ酸修飾は、アミド化、カルボキシル化、硫酸化、ハロゲン化、アルキル化、グリコシル化、リン酸化、水酸化、アシル化（例えば、アセチル化）などを含むが、これらに限定されない。置換、または付加されるアミノ酸は、天然のアミノ酸であってもよく、非天然のアミノ酸、またはアミノ酸アナログでもよい。天然のアミノ酸が好ましい。

【0044】

用語「天然のアミノ酸」とは、天然のアミノ酸のL-異性体を意味する。天然のアミノ酸は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、メチオニン、トレオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、システイン、プロリン、ヒスチジン、アスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン酸、グルタミン、 γ -カルボキシグルタミン酸、アルギニン、オルニチン、およびリジンである。特に示されない限り、本明細書でいう全てのアミノ酸はL体である。

【0045】

用語「非天然アミノ酸」とは、タンパク質中で通常は天然に見出されないアミノ酸を意味する。非天然アミノ酸の例として、ノルロイシン、パラ-ニトロフェニルアラニン、ホモフェニルアラニン、パラ-フルオロフェニルアラニン、3-アミノ-2-ベンジルプロピオン酸、ホモアルギニンのD体またはL体およびD-フェニルアラニンが挙げられる。

【0046】

「アミノ酸アナログ」とは、アミノ酸ではないが、アミノ酸の物性および／または機能に類似する分子をいう。アミノ酸アナログとしては、例えば、エチオニン、カナバニン、2-メチルグルタミンなどが挙げられる。

【0047】

本発明のさらなる実施態様において、デカルバミラーゼの変異体はまた、アンモニウム塩（アルキルまたはアリールアンモニウム塩を含む）、硫酸塩、硫酸水素塩、リン酸塩、リン酸水素塩、リン酸二水素塩、チオ硫酸塩、炭酸塩、重炭酸塩、安息香酸塩、スルホン酸塩、チオスルホン酸塩、メシレート（メチルスルホ

ン酸)塩、エチルスルホン酸塩、およびベンゼンスルホン酸塩のようなペプチドの塩の形態を取り得る。

【0048】

以下、変異体を生成するためのタンパク質のアミノ酸の変異について議論する。アミノ酸の置換などを実施する方法は、化学合成、または遺伝子工学を利用する技術においてアミノ酸をコードするDNA配列のコドンを変化させることを含むが、これらに限定されない。

【0049】

あるアミノ酸は、相互作用結合能力の明らかな低下または消失なしに、例えば、カチオン性領域または基質分子の結合部位のようなタンパク質構造において他のアミノ酸に置換され得る。あるタンパク質の生物学的機能を規定するのは、タンパク質の相互作用能力および性質である。従って、特定のアミノ酸の置換がアミノ酸配列において、またはそのDNAコード配列のレベルにおいて行われ得、置換後もなお、もとの性質を維持するタンパク質が生じ得る。従って、生物学的有用性の明らかな損失なしに、種々の改変が、開示されたペプチドまたはこのペプチドをコードする対応するDNAにおいて行われ得る。

【0050】

上記のような改変を設計する際に、アミノ酸の疎水性指数が考慮され得る。タンパク質における相互作用的な生物学的機能を与える際の疎水性アミノ酸指数の重要性は、一般に当該分野で認められている(Kyte, JおよびDoolittle, R. F. J. Mol. Biol. 157 (1): 105-132, 1982)。アミノ酸の疎水的性質は、生成したタンパク質の二次構造に寄与し、次いでそのタンパク質と他の分子(例えば、酵素、基質、レセプター、DNA、抗体、抗原など)との相互作用を規定する。各アミノ酸は、それらの疎水性および電荷の性質に基づく疎水性指数を割り当てられる。それらは: イソロイシン(+4.5); バリン(+4.2); ロイシン(+3.8); フェニルアラニン(+2.8); システイン/シスチン(+2.5); メチオニン(+1.9); アラニン(+1.8); グリシン(-0.4); スレオニン(-0.7); セリン(-0.8); トリプトファン(-0.9); チロシン(-1.3); プロリン

(-1.6) ; ヒスチジン (-3.2) ; グルタミン酸 (-3.5) ; グルタミン (-3.5) ; アスパラギン酸 (-3.5) ; アスパラギン (-3.5) ; リジン (-3.9) ; およびアルギニン (-4.5)) である。

【0051】

あるアミノ酸を、同様の疎水性指数を有する他のアミノ酸により置換して、そして依然として同様の生物学的機能を有するタンパク質（例えば、酵素活性において等価なタンパク質）を生じさせ得ることが当該分野で周知である。このようなアミノ酸置換において、疎水性指数が±2以内であることが好ましく、±1以内であることがより好ましく、および±0.5以内であることがさらに好ましい。疎水性に基づくこのようなアミノ酸の置換は効率的であることが当該分野において理解される。米国特許第4、554、101号に記載されるように、以下の親水性指数がアミノ酸残基に割り当てられている：アルギニン (+3.0) ; リジン (+3.0) ; アスパラギン酸 (+3.0±1) ; グルタミン酸 (+3.0±1) ; セリン (+0.3) ; アスパラギン (+0.2) ; グルタミン (+0.2) ; グリシン (0) ; スレオニン (-0.4) ; プロリン (-0.5±1) ; アラニン (-0.5) ; ヒスチジン (-0.5) ; システイン (-1.0) ; メチオニン (-1.3) ; バリン (-1.5) ; ロイシン (-1.8) ; イソロイシン (-1.8) ; チロシン (-2.3) ; フェニルアラニン (-2.5) ; およびトリプトファン (-3.4)。アミノ酸が同様の親水性指数を有しかつ依然として生物学的等価体を与え得る別のものに置換され得ることが理解される。このようなアミノ酸置換において、親水性指数が±2以内であることが好ましく、±1以内であることがより好ましく、および±0.5以内であることがさらに好ましい。

【0052】

本発明において、「保存的置換」とは、アミノ酸置換において、元のアミノ酸と置換されるアミノ酸との親水性指数または／および疎水性指数が上記のように類似している置換をいう。保存的置換の例は、当業者に周知であり、例えば、次の各グループ内での置換：アルギニンおよびリジン；グルタミン酸およびアスパラギン酸；セリンおよびスレオニン；グルタミンおよびアスパラギン；ならびに

バリン、ロイシン、およびイソロイシン、などが挙げられるがこれらに限定されない。

【0053】

酵素の比活性向上および反応の至適pHの最適化を目指した分子設計においては、立体構造から得られた触媒反応機構に関する情報は極めて有用である。本発明においては、デカルバミラーゼのCys171の側鎖スルフィド(SH)基のpKaを変化させることによって、比活性および至適pHの変化を伴うアミノ酸変異を設計し得る。具体的には、タンパク質の静電ポテンシャル計算(高橋ら、(1992)、Biopolymers 32, 897-909)により、SH基のpKaに対するアミノ酸変異の効果を見積もることができ、適切なアミノ酸変異を設計し得る。例えば、Cys171の硫黄原子近傍の静電場をより正の電場にし、Cys171のチオール基(SH)の解離を促進させ、かつGlu46および/またはGlu145の側鎖カルボキシ基近傍の静電場にはあまり影響しない変異が望ましい。

【0054】

本発明のデカルバミラーゼの立体構造から、デカルバミラーゼ中に存在する5つのシステイン残基は、触媒活性および空気酸化に対する耐性等の機能、物性に関与していることが推定される。デカルバミラーゼのシステイン残基の役割については、上記菌株(Agrobacterium sp. KNK712(カネカ菌))由来のデカルバミラーゼと比較して、高い配列相同性を有する、異なる菌株(Agrobacterium radiobacter NRRL B11291)由来のデカルバミラーゼについて、アミノ酸変異ならびに変性剤およびCys修飾試薬の組合せによる研究がなされている(R. Grifantiniら、(1996)、J. Biol. Chem. 271, 9326-9331)。この研究では、5残基のシステインはいずれもジスルフィド結合の形成には関与しないこと、Cys171に対応するA. radiobacter NRRL B11291由来のデカルバミラーゼのCys172のSerへの置換で触媒活性が失われるが、それ以外のシステインの変異では触媒活性に影響がないことから、Cys171が触媒活性に必須であることが推定されている。これは、他

の類縁酵素においても、対応するシステイン残基が保存されていることから強く示唆される。本明細書中において、「対応する」アミノ酸とは、あるタンパク質分子またはポリペプチド分子において、比較の基準となるタンパク質またはポリペプチドにおける所定のアミノ酸と同様の作用を有するか、または有することが予測されるアミノ酸をいい、特に酵素分子にあっては、活性部位中の同様の位置に存在し触媒活性に同様の寄与をするアミノ酸をいう。

【0055】

配列番号1および2のアミノ酸配列を有するデカルバミラーゼでは、また、Cys 192およびCys 249は化学修飾を受け難く、分子内に埋もれていることが、そしてCys 242およびCys 278は容易に化学修飾を受け、分子表面のループ構造部分に位置していることが推定されている。配列番号1のCys 242およびCys 278に対応する、*A. radiobacter* NRRL B11291の2残基（それぞれ、Cys 243およびCys 279）のシステインをアラニンに置換することで安定性を向上した変異体を取得されている（特開平8-84584号公報）。上記のように、Cys 242およびCys 278については、立体構造から分子表面に存在することが確認され、これらCys残基がデカルバミラーゼの空気酸化に対する耐性に関与していることが示唆される。分子内に埋もれたCys 192およびCys 249については、空気酸化に対する耐性向上への寄与は大きくないと推定されるが、側鎖体積あるいは分子内空孔を補完するように、より嵩高い疎水性アミノ酸残基に置換した変異体を作製することにより、熱または有機溶剤に対する安定性の向上したデカルバミラーゼが創製され得る。

【0056】

デカルバミラーゼの空気酸化による酵素活性の低下および保存安定性には、システイン残基だけでなくメチオニン残基の関与も考えられ得る。本発明のデカルバミラーゼの立体構造から、デカルバミラーゼ中にある9つのメチオニン残基のうち、完全に分子内部に埋もれたものが5残基存在する一方で、完全に分子外部に露出したものが2残基（Met 238およびMet 243）ターン構造部分に存在し、この2残基はデカルバミラーゼの空気酸化に対する耐性に大きく関わっ

ていることが推定される。本明細書において「ターン」構造または「 β ターン」構造とは、タンパク質の立体構造において、二次構造の間で、ペプチド主鎖の進み方向を大きく変化させる3つ以上のアミノ酸残基からなる局所構造をいう。また、Met 4 および Met 72 は、分子表面近傍に存在し、ほとんど分子内部に埋もれているが溶媒分子等ものの容易に接触し得る部位にあるため、これらもデカルバミラーゼの空気酸化に対する耐性に関与している可能性がある。これら構造的知見から、デカルバミラーゼの空気酸化に対する耐性向上が期待される別のアミノ酸置換を設計し得る。すなわち、Met 4 および Met 72 を、側鎖体積あるいは分子内空孔を補完し、かつ空気酸化を受けない疎水性アミノ酸残基に置換した変異体を作製することにより耐性向上を達成し得る。Met 238 および Met 243 は、完全に分子外部に露出していることから、好ましくはこれら残基を空気酸化を受けない中性あるいは親水性アミノ酸に置換することにより耐性の向上を達成し得る。さらに、デカルバミラーゼのアミノ酸 Met 238 から Met 243 までの領域により構成されるターン構造部分には、空気酸化に弱い Cys 242 も含まれることから、これら3残基を適切なアミノ酸に置換した3重変異体を作製、あるいは3残基を含むターン構造を欠失した変異体を作製することによって、空気酸化に対する耐性を向上し得る。また、これら残基を含むターン構造の配列を他のタンパク質の β ターン構造と入れ替えることによっても、空気酸化に対する耐性を向上し得る。システインおよびメチオニンの変異体設計においては、これら残基を他のアミノ酸にコンピューター上で変異させ、変異体の安定性について構造エネルギーを解析することにより、最適なアミノ酸を選択し得る。

【0057】

システイン残基およびメチオニン残基以外にも、タンパク質分子内の空孔（例えば、デカルバミラーゼのアミノ酸 Asn 92 の近傍に形成される空孔）を補填するアミノ酸変異、エネルギー的に不利なコンフォメーションを有するアミノ酸（例えば、デカルバミラーゼのアミノ酸 Pro 203 および Val 236）の変異、および α ヘリックス構造の安定化など、一般的に知られているタンパク質の安定化要因に着目した設計も行い得る。

【 0 0 5 8 】

前記アミノ酸変異による改変設計と異なる設計戦略として、デカルバミラーゼの酵素活性に関与しないと推定される領域を欠失させ、デカルバミラーゼをより低分子量の酵素へと改変することにより安定性を向上させ得る。例えば、活性部位から離れた位置にあるループ状構造領域の一部または全部を欠失させることにより、より緻密なデカルバミラーゼへと改変し得る。また、デカルバミラーゼのカルボキシ末端から約 3 0 残基の領域は、二量体形成に関与していることが本発明者らにより推定された。デカルバミラーゼは、一般的な緩衝液中において触媒能を示す場合は、二量体あるいは四量体として存在すると推定される。他方、タンパク質の変性状態からの巻き戻り過程からは、単量体タンパク質の方が有利であると推定される。カルボキシ末端約 3 0 残基の領域の一部または全部を欠失することにより、二量体形成を阻害し、安定な単量体を調製し得る。工業的には、デカルバミラーゼは担体に固定化したいわゆる固定化酵素として利用されるが、この場合も単量体の方が、より効率的な固定化を達成し得る。

【 0 0 5 9 】

本発明におけるデカルバミラーゼ変異体は、上記の方法以外にも、多くの方法により設計または調製され得る。例えば、デカルバミラーゼ活性を有する酵素の配列は、本発明を用いて変異に望ましいと特定された部位において、オリゴヌクレオチド特異的変異誘発または他の従来の技術（例えば、欠失）手段により変異され得る。あるいは、デカルバミラーゼの変異体は、特定のアミノ酸の、天然に存在しないアミノ酸での部位特異的置換により作製され得る。例えば、デカルバミラーゼ変異体は、特定のシステインまたはメチオニン残基の、セレノシステインまたはセレノメチオニンとの置換により作製され得る。これは、天然システインまたはメチオニンのいずれか（あるいは両方）を潤渇させ、かつセレノシステインまたはセレノメチオニン（あるいは両方）を富化した増殖培地上で、野生型ポリペプチドまたは変異体ポリペプチドのいずれかを発現し得る宿主生物を増殖させることにより達成され得る。相同組換え法を用いる場合、合成オリゴヌクレオチドを用いて、デカルバミラーゼをコードする DNA 配列中に変異が導入され得る。これらのオリゴヌクレオチドは所望の変異部位に隣接するヌクレオチド配

知られているタンパク質の配列データベース、PIR Release 57（米国国立バイオテクノロジー情報センター、NCBI）に対する配列類似性解析からアミダーゼ、ニトリラーゼ等の加水分解酵素と25～30%程度の弱い配列類似性を有することが明らかになっている。しかしながら、弱い配列類似性を有するこれらの酵素の立体構造は、これまでいずれも明らかにはされていない。そのため、分子設計手法でしばしば用いられる類似タンパク質の立体構造を用いたいわゆるホモロジーモデリングの手法（例えば、Swiss-Pdbviewer（モデリングプログラム）（Swiss Institute of Bioinformatics (SIB)、ExPASy Molecular Biology Server (<http://www.expasy.ch/>より入手可能)）；Guex, N. およびPeitsch, M. C. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling, Electrophoresis 18, 2714-2723)により、デカルバミラーゼの立体構造を推定することは事実上不可能であった。また、仮に類縁酵素の立体構造が決定されたとしても、30%に満たない弱い配列類似性では、合理的な分子設計手法を適用するために十分な精度をもって立体構造モデルを得ることは難しい。酵素反応の至適pHの変更、比活性向上に関するアミノ酸変異等を精度良く予測し、それに基づき分子設計するためには、デカルバミラーゼの精密な原子座標データが必須である。デカルバミラーゼの立体構造を決定することができれば、精密な立体構造の解析、およびこれに基づく合理的な分子設計手法を適用することが可能となり、ひいては工業利用に有利な改変酵素を迅速かつ効率的に取得することも可能となる。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、このような課題を解決すべく、現在工業利用に供されているデカルバミラーゼの単結晶を取得し、X線結晶構造解析によりその立体構造を明らかにすることを目的とする。本発明はまた、デカルバミラーゼの立体構造を利用して、基質であるD-N-カルバモイル- α -アミノ酸類に対する反応性の向上、反

限され、生産物のコストに与える影響が大きい。

【0005】

有用な反応を触媒する酵素を有効に工業利用するためには、安定性などの物性または触媒能の高い優れた酵素を迅速かつ効率的に創製する手法が望まれる。物性または機能を改良した酵素を取得する方法としては、酵素をコードする遺伝子に化学処理または酵素処理などにより人為的な変異を加え、変異を含んだ組換え体DNAを宿主細胞に導入して、目的の機能および／または物性を有する酵素をスクリーニングするいわゆるランダムスクリーニング法がよく知られている。一方、近年の構造生物学の進歩に伴い、酵素などの数多くのタンパク質の立体構造がX線結晶解析またはNMR解析により明らかにされてきており、その立体構造および分子設計手法を用いたタンパク質の物性または機能改変も盛んに行われるようになっている。

【0006】

ここで、「タンパク質の立体構造」とは、あるアミノ酸配列を有するタンパク質がある条件下で折り畳まれて形成される、ある条件およびそのアミノ酸配列によって規定されるタンパク質の三次元構造のことをいう。タンパク質の立体構造は、例えば、X線結晶構造解析または核磁気共鳴によって決定され得る。

【0007】

デカルバミラーゼの物性の改変については、ランダムスクリーニング法により耐熱性の向上した酵素生産株（*E. coli* JM109）をスクリーニングすることに成功し、工業利用に有利なデカルバミラーゼ変異体が取得されている（国際公開WO94/03613号パンフレット）。また、部位特異的変異誘発により、安定性の向上した変異体（特開平9-173068号公報）が取得されている。しかし、これらの例は、アミノ酸の一次配列のみに基づいて変異体を作製したものであって、酵素の立体構造を利用した合理的な分子設計手法を活用したものではない。

【0008】

これまでにデカルバミラーゼおよびその類縁酵素であって、その立体構造が明らかにされたものは知られていない。デカルバミラーゼは、アミノ酸配列が既に

発明は、上記立体構造を利用してデカルバミラーゼ変異体を製造する方法、得られたデカルバミラーゼ変異体、および、その利用に関する。

【0002】

【従来の技術】

光学活性なD- α -アミノ酸類は医薬中間体として重要な化合物であり、特に半合成ペニシリン類または半合成セファロスポリン類の製造中間体であるD-フェニルグリシン、D-パラヒドロキシフェニルグリシンなどが工業的に有用な化合物例として挙げられる。このようなD- α -アミノ酸類の製造法としては、対応するD-N-カルバモイル- α -アミノ酸類のカルバモイル基を除去してこれらを得る方法が公知であり、この際のカルバモイル基の除去は化学的方法または微生物の酵素反応を利用する方法によって行われる。

【0003】

カルバモイル基の除去を行う酵素は、デカルバミラーゼと呼ばれる。この酵素は、D-N-カルバモイル- α -アミノ酸のD- α -アミノ酸類への変換を触媒する。この酵素は、シュードモナス属、アグロバクテリウム属、アエロバクター属、アエロモナス属、プレビバクテリウム属、バチルス属、フラボバクテリウム属、セラチア属、マイクロコッカス属、アースロバクター属、アルカリゲネス属、アクロモバクター属、モラキセラ属、パラコッカス属、ブラストバクター属、およびコマモナス属から同定されている。デカルバミラーゼのアミノ酸配列および／または核酸配列は、アグロバクテリウム属から決定されており、例えば、*Agrobacterium radiobacter* NRRL B11291および*Agrobacterium* sp. KNK712（カネカ菌）が挙げられる。

【0004】

一般に、酵素は常温または高温でこれを反応に用いる工業利用の際の条件に耐え得るほど十分な安定性を有していない場合が多く、その安定性が生産物のコストに影響する場合が多い。また、酵素反応を有利に進行させる手段として、固定化酵素または固定化菌体等のいわゆる「バイオリアクター」として繰り返し反応に用いることが行われているが、この際にも酵素の安定性によって使用回数が制

カルバミラーゼ変異体を産生する工程を包含する、方法。

【請求項 2 6】 前記立体構造が、請求項 1 4、1 6、または 2 1 のいずれか 1 項に記載のデカルバミラーゼの立体構造である、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】 前記デカルバミラーゼ変異体を設計する工程が、酵素の基質特異性の変更、酵素比活性の変更、酵素の安定性向上、酵素の至適 p H の最適化、および酵素の水溶性の変更からなる群から選択される 1 以上の酵素特性の改変を目的とする、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 8】 前記酵素特性の改変が、酵素の安定性向上を含む、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 9】 酵素の安定性向上に関する変異体の設計が、空気酸化による活性低下を招くアミノ酸残基を置換する変異を含む、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 0】 前記酵素特性の改変が、酵素比活性の変更および酵素の至適 p H の最適化を含む、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 3 1】 請求項 2 5 ～ 3 0 のいずれか 1 項に記載の製造方法によって得られたデカルバミラーゼ変異体。

【請求項 3 2】 請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載のデカルバミラーゼ結晶の立体構造または請求項 1 4、1 6、または 2 1 のいずれか 1 項に記載のデカルバミラーゼの立体構造を利用して、アミノ酸一次配列がデカルバミラーゼと類似する別のポリペプチド酵素またはタンパク質酵素を改変する方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、D-N-カルバモイル- α -アミノ酸を対応するD- α -アミノ酸に変換する酵素（以下、デカルバミラーゼという）の結晶に関する。また、本発明は、該結晶を用いたX線結晶構造解析により決定されたデカルバミラーゼの立体構造およびその利用、特に、該立体構造を利用したデカルバミラーゼの耐熱性、有機溶剤耐性、空気酸化に対する耐性等の安定性、酵素反応の至適 p H の変更および比活性向上に関するアミノ酸の変異を設計する方法に関する。さらに、本

ーバリン、D-N-カルバモイル-アラニン、D-N-カルバモイル-システイン、D-N-カルバモイル-アスパラギン酸、D-N-カルバモイル-グルタミン酸、D-N-カルバモイル-グリシン、D-N-カルバモイル-ヒスチジン、D-N-カルバモイル-イソロイシン、D-N-カルバモイル-リジン、D-N-カルバモイル-ロイシン、D-N-カルバモイル-メチオニン、D-N-カルバモイル-アスパラギン、D-N-カルバモイル-プロリン、D-N-カルバモイル-グルタミン、D-N-カルバモイル-アルギニン、D-N-カルバモイル-セリン、D-N-カルバモイル-スレオニン、D-N-カルバモイル-トリプトファン、およびD-N-カルバモイル-チロシンからなる群から選択される、請求項16～19のいずれか1項に記載の酵素分子またはその活性断片。

【請求項21】 請求項14または15に記載のデカルバミラーゼの立体構造から分子設計手法により構築された、デカルバミラーゼまたはその変異体あるいはそれらの活性断片とD-N-カルバモイル- α -アミノ酸あるいはD- α -アミノ酸との複合体立体構造により特徴付けられる、デカルバミラーゼ複合体。

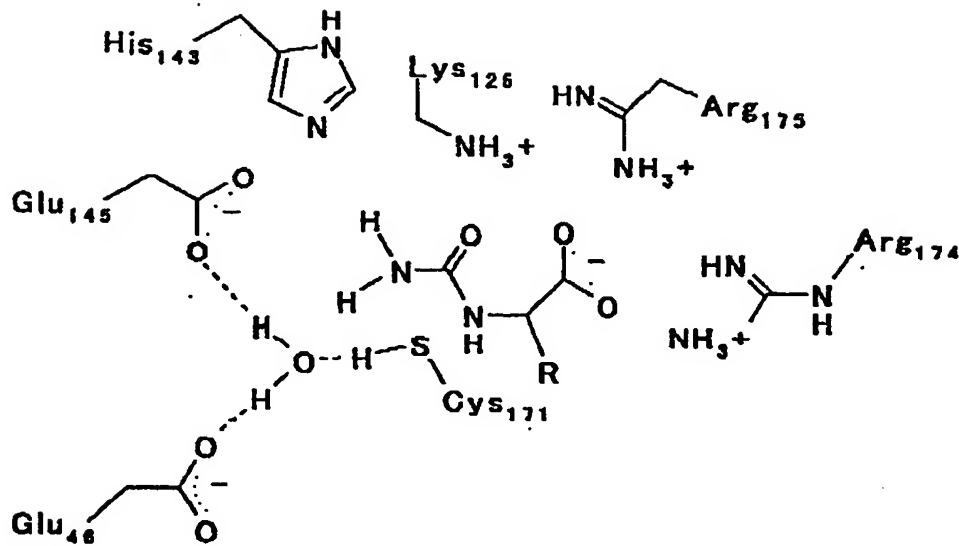
【請求項22】 デカルバミラーゼ変異体を設計する方法であって、デカルバミラーゼの請求項14、16、または21のいずれか1項に記載の立体構造に基づいて物性および／または機能を改変したデカルバミラーゼ変異体を設計する工程を包含する、方法。

【請求項23】 デカルバミラーゼ変異体を設計する方法であって、デカルバミラーゼ活性を有する酵素の結晶を生成する工程、該結晶のX線結晶構造解析により該結晶の立体構造を決定する工程、および決定した立体構造に基づいて物性および／または機能の向上したデカルバミラーゼ変異体を設計する工程を包含する、方法。

【請求項24】 前記立体構造が、請求項14、16、または21のいずれか1項に記載のデカルバミラーゼの立体構造である、請求項23に記載の方法。

【請求項25】 デカルバミラーゼ変異体を製造する方法であって、デカルバミラーゼ活性を有する酵素の結晶を生成する工程、該結晶のX線結晶構造解析により該結晶の立体構造を決定する工程、決定した立体構造に基づいて物性および／または機能の向上したデカルバミラーゼ変異体を設計する工程、および該デ

【化 2】



ここで、置換基Rは、D-N-カルバモイル- α -アミノ酸の側鎖である。

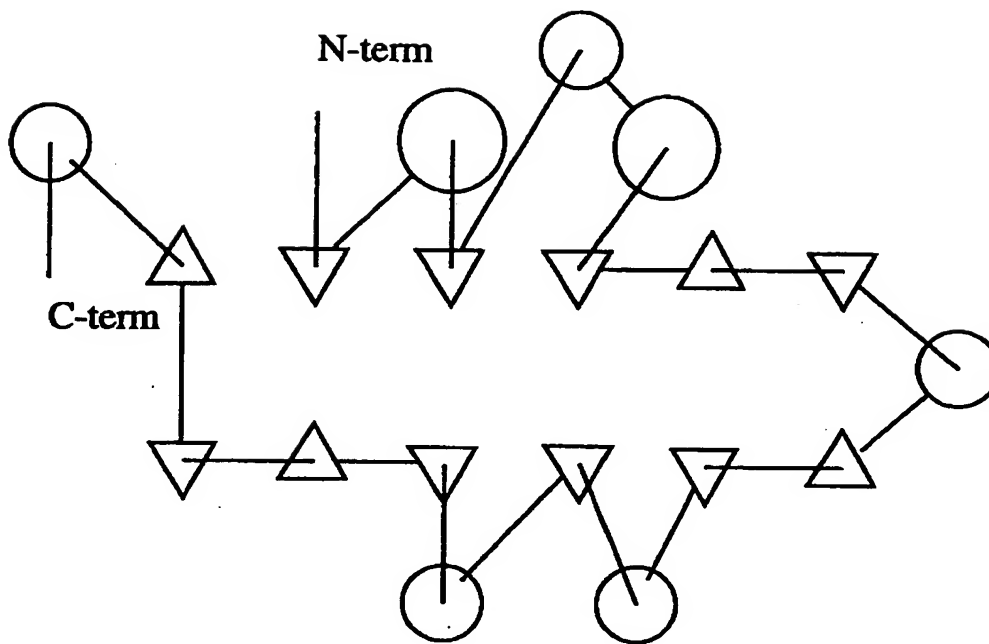
【請求項17】 D-N-カルバモイル- α -アミノ酸を基質とするデカルバミラーゼ活性を有する酵素分子であって、少なくとも、配列番号1または2における以下のアミノ酸：46位のGlu、126位のLys、145位のGlu、および171位のCys、に対応するアミノ酸から形成される活性部位腔を有する、酵素分子またはその活性断片。

【請求項18】 前記活性部位腔において、前記D-N-カルバモイル- α -アミノ酸が、反応時に前記配列番号1または2の126位のLys、143位のHis、145位のGlu、174位のArg、175位のArg、および197位のThrに対応するアミノ酸と相互作用し得る、請求項17に記載の酵素分子またはその活性断片。

【請求項19】 前記活性部位腔において、前記配列番号1または2の46位のGlu、145位のGlu、および171位のCysに対応するアミノ酸が水分子を介して水素結合している、請求項17または18に記載の酵素分子またはその活性断片。

【請求項20】 前記D-N-カルバモイル- α -アミノ酸が、D-N-カルバモイル-フェニルグリシン、D-N-カルバモイル-パラヒドロキシフェニルグリシン、D-N-カルバモイル-フェニルアラニン、D-N-カルバモイル-

【化 1】



【請求項 15】 4本の α ヘリックスおよび12本の β ストランドを含む二次構造を含む4層サンドイッチ構造を有する、デカルバミラーゼまたはその活性断片。

【請求項 16】 酵素反応に関与するアミノ酸残基がシステイン1残基、グルタミン酸2残基、およびリジン1残基であり、酵素反応の基質がD-N-カルバモイル- α -アミノ酸であって、以下の図に示す基質結合様式を有する活性部位の立体構造により特徴付けられる、デカルバミラーゼまたはデカルバミラーゼ変異体、あるいはそれらの活性断片：

る工程、および得られる混合溶液を、該溶液中のデカルバミラーゼ結晶が既定の大きさ以上に成長するまで既定の期間放置する工程を包含する、方法。

【請求項 9】 前記混合する工程が、前記デカルバミラーゼ溶液の液滴を前記沈澱剤溶液の液滴と混合させることを包含し、そして前記放置する工程が、混合工程で得られる混合液滴を密閉容器中で沈澱剤溶液を保持する溶液溜め部上に懸垂させることを包含し、ここで、該溶液溜め部中の該沈澱剤溶液の蒸気圧は該混合液滴の蒸気圧より低い、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】 前記混合する工程が、前記デカルバミラーゼ溶液の液滴を前記沈澱剤溶液の液滴と混合させることを包含し、そして前記放置する工程が、混合工程で得られる混合液滴を密閉容器中で沈澱剤溶液を保持する溶液溜め部の液滴台に静置させることを包含し、ここで、該溶液溜め部中の該沈澱剤溶液の蒸気圧は該混合液滴の蒸気圧より低い、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】 前記混合溶液を放置する期間が 1 日～3 週間である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 12】 前記デカルバミラーゼの溶液を与える工程の後に、該デカルバミラーゼ溶液をサイズ排除半透膜内に配置させる工程をさらに包含し、そして前記混合する工程が、該半透膜を通して沈澱剤溶液を該デカルバミラーゼ溶液中に拡散させることを包含する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 13】 前記混合する工程が、前記沈澱剤溶液を前記デカルバミラーゼ溶液に徐々に添加することを包含し、そして前記放置する工程が、得られる混合溶液を密閉容器内で放置することを包含する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 14】 以下の図に示すタンパク質立体構造トポロジーを有する立体構造により特徴付けられるデカルバミラーゼまたはその活性断片：

【特許出願人】

【識別番号】 000000941

【氏名又は名称】 鐘淵化学工業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100078282

【弁理士】

【氏名又は名称】 山本 秀策

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 001878

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9407889

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 デカルバミラーゼの立体構造およびその利用法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 直方晶系の空間群 $P 2_1 2_1 2$ および配列番号 1 に示されるアミノ酸配列、または直方晶系の空間群 $P 2_1 2_1 2_1$ および配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を有する、デカルバミラーゼ結晶。

【請求項 2】 前記結晶が直方体形状の単位格子を有し、単位格子定数： $a = 66.5 \sim 68.5 \text{ \AA}$ 、 $b = 135.5 \sim 138.0 \text{ \AA}$ 、 $c = 66.5 \sim 68.5 \text{ \AA}$ を有し、そして前記アミノ酸配列が配列番号 1 である、請求項 1 に記載のデカルバミラーゼ結晶。

【請求項 3】 前記結晶が直方体形状の単位格子を有し、単位格子定数： $a = 68.5 \sim 70.5 \text{ \AA}$ 、 $b = 138.0 \sim 140.5 \text{ \AA}$ 、 $c = 68.5 \sim 73.0 \text{ \AA}$ を有し、そして前記アミノ酸配列が配列番号 1 である、請求項 1 に記載のデカルバミラーゼ結晶。

【請求項 4】 前記結晶が直方体形状の単位格子を有し、単位格子定数： $a = 81.5 \sim 82.5 \text{ \AA}$ 、 $b = 133.0 \sim 135.0 \text{ \AA}$ 、 $c = 119.5 \sim 121.5 \text{ \AA}$ を有し、そして前記アミノ酸配列が配列番号 2 である、請求項 1 に記載のデカルバミラーゼ結晶。

【請求項 5】 結晶中のデカルバミラーゼ 1 分子当たり少なくとも 1 つ以上の重金属原子を含む請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の結晶。

【請求項 6】 重金属原子が水銀、金、白金、鉛、イリジウム、オスミウムおよびウランのうちいずれかである請求項 5 に記載の結晶。

【請求項 7】 請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載のデカルバミラーゼ結晶を液体窒素下で凍結させることにより調製される凍結結晶。

【請求項 8】 デカルバミラーゼ結晶の製造方法であって、 $1 \sim 50 \text{ mg/ml}$ の濃度でデカルバミラーゼの溶液を与える工程、 $5 \sim 30$ 重量%の濃度でポリエチレングリコール (PEG) あるいはメトキシポリエチレングリコール (PEGMME) を含有し、かつ $6.0 \sim 9.0$ の pH を与える濃度の緩衝剤を含有する沈澱剤溶液を与える工程、該デカルバミラーゼ溶液を該沈澱剤溶液と混合す